

**Untersuchungen zur strukturellen und funktionellen  
Homologie zwischen dem Kinetochor-Komplex der Hefe  
*Saccharomyces cerevisiae* und dem des Menschen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

**Diplom-Biochemiker Gerhard Dieter Wieland**

geboren am 7. August 1966 in Nürnberg

# Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungen .....	V
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Das Kinetochor von <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Centromer-DNA .....	4
1.1.2. Proteine im Kinetochor der Hefe.....	4
1.1.2.1 Der Cbf3-Proteinkomplex .....	4
1.1.2.2. Weitere Kinetochor-Proteine der Bäckerhefe .....	6
<b>1.2. Der Kinetochor-Komplex des Menschen .....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Das Centromer .....	12
1.2.2. Die Proteine des Kinetochors humaner Chromosomen.....	12
<b>1.3. RNA-Interferenz.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4. Fluoreszierende Proteine.....</b>	<b>21</b>
1.4.1. Das grün fluoreszierende Protein GFP und Varianten .....	21
<b>1.5. Ziel der Arbeit und Arbeitshypothese .....</b>	<b>23</b>
<b>2. Materialien und Methoden.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Materialien .....</b>	<b>24</b>
2.1.1. Geräte und technische Ausrüstung.....	24
2.1.2. Chemikalien .....	25
<b>2.2. Materialien für molekular- und zellbiologische Arbeiten .....</b>	<b>26</b>
2.2.1. DNA-Oligos für PCR-Ansätze.....	26
2.2.2. Doppelsträngige RNA-Oligos für RNAi-Versuche .....	27
2.2.3. Plasmide .....	28
2.2.4. Antikörper .....	28
2.2.5. Enzyme .....	28
2.2.6. Zelllinien und Organismen.....	29
<b>2.3. Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.3.1. Allgemeines.....	30
2.3.2. Puffer und Medien .....	30
2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	31
2.3.4. Plasmid-Isolierung .....	31
2.3.4.1. Isolierung kleiner Mengen von Plasmid-DNA .....	31

---

2.3.4.2.	Isolierung großer Mengen von Plasmid-DNA .....	32
2.3.5.	Restriktionsspaltungen von DNA.....	32
2.3.5.1.	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.3.6.	Isolierung von DNA-Fragmenten .....	33
2.3.7.	DNA-Konzentration .....	33
2.3.8.	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	33
2.3.8.1.	Coomassie-Brillant-Blue-Proteinfärbung.....	34
2.3.9.	Genomische DNA der Bäckerhefe .....	34
2.3.10.	Konstruktion von GFP-Fusionsvektoren.....	35
2.3.11.	CENP-A .....	40
2.3.12.	Zellkultur.....	40
2.3.13.	Transfektion von GFP-Fusions-Plasmiden in humane Zellen.....	41
2.3.14.	Stabile Zelllinien .....	42
2.3.15.	Antikörper und Immunfluoreszenz.....	42
2.3.16.	Western Blotting .....	43
2.3.17.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	45
2.3.18.	RNA-Interferenz .....	46
2.3.19.	Zell-Assays .....	47
2.3.20.	Das „Abschütteln mitotischer Zellen“ .....	48
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1.	Klonierung von Kinetochor-Proteinen in humane Expressionsvektoren .....	49
3.1.1.	Stabile Zelllinien .....	49
3.2.	Lokalisation von Kinetochor-Proteinen der Hefe <i>S. cerevisiae</i> in menschlichen Zellen.....	49
3.3.	Cse4 ersetzt die Funktion von CENP-A.....	54
3.4.	Analyse weiterer konservierter <i>Saccharomyces-cerevisiae</i> -Kinetochor-Proteine in menschlichen Zellen.....	60
3.5.	Analyse von nicht sequenz-konservierten <i>S. cerevisiae</i> -Kinetochorproteinen in menschlichen Zellen.....	62
3.6.	Statistische Auswertung der Lokalisationsstudien .....	63
3.7.	Kontrollen .....	65
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
4.1.	Proteine des Kinetochors der Hefe mit humanen Homologen .....	66
4.2.	Hefe-Proteine ohne humane Homologe.....	70
4.3.	Cse4 ersetzt CENP-A funktionell.....	71

---

5. Zusammenfassung und Ausblick.....	74
6. Literatur-Verzeichnis.....	75
Selbständigkeitserklärung .....	i
Lebenslauf .....	ii
Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Poster.....	iii
Danksagung.....	iv



---

## Abkürzungen

A	Adenin
$\alpha$	anti
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ACA	Anti-Centromer-Antikörper
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH-Zip	basische Region-HLH-Leucin-Zipper
Bis	N, N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bZip	basische Region-Leucin-Zipper
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CDE	Centromer determinierendes Element
CEN	Centromer-DNA
CENP	Centromer-Protein
CFP	cyanfarben fluoreszierendes Protein
CLSM	Konfokales <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop
CREST	„CREST“-Syndrom
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	„ <i>Dulbeccos modified Eagles medium</i> “, Zellkultur-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid-Triphosphat
ds	doppelsträngig
D.s.	<i>Discosoma species</i> (Scheiben-Anemone)
DsRed	Rot fluoreszierendes Protein
DTT	Dithiothreitol

---

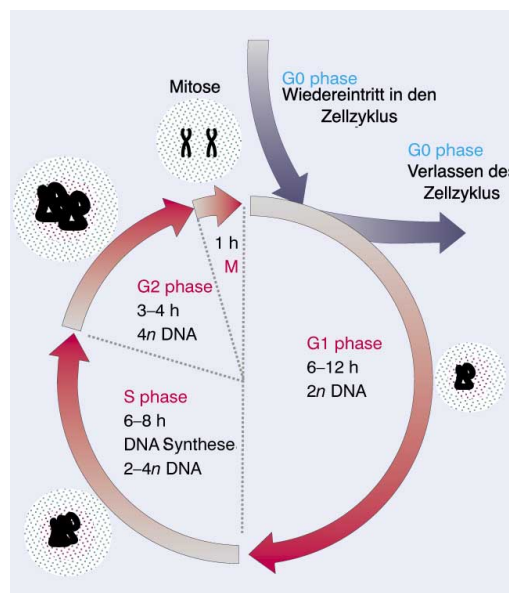
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Verstärktes („enhanced“) grün fluoreszierendes Protein
EtOH	Ethanol
g	Gramm
g	Gravitationskonstante, (9,81 m/s <sup>2</sup> )
G	Guanin
G-418	G-418-Sulfat, <i>Geneticin</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
G-Phase	„gap“-Phase des Zellzyklus
HEPES	2-(Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix-DNA-Bindemotiv
<i>H.s.</i>	<i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galacto-pyranosid
Kan	Kanamycin
k	kilo
kb	Kilobase
kbp	Kilobasenpaar(e)
LB	Luria-Bertani-Medium
m	milli
M	Molar
Mbp	Megabasenpaar(e)
MCS	Multiple Klonierungs-Stelle
min	Minute
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
Mr	relative Molekülmasse
mRNA	„messenger“-RNA
N	Nucleotid (Adenosin, Cytidin, Guanosin, Thymidin)
NLS	„nuclear localisation signal“
NTA	Nitrilotriacetat
OD	Optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-elektrophorese
PBS	mit Phosphat gepufferte Saline

---

PBS-T	PBS mit 1% Triton X-100
PCNA	" <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> "
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	„ <i>small interfering</i> “ RNA (ds-RNAi-Oligo)
S-Phase	Synthese-Phase im Zellzyklus
T	Thymin
Topo I	Topoisomerase I
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylenethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜNK	Übernachtkultur
YFP	Gelb („yellow“) fluoreszierendes Protein
YPD	Hefe-Kultur-Medium
Zip	Leucin-Zipper

# 1. Einleitung

Die DNA ist der Informationsspeicher der Zelle. Es muss dafür gesorgt werden, dass die vollständige Information möglichst fehlerfrei auf die Tochterzellen übertragen wird. Im Gegensatz zu den Prokaryoten, bei denen sich DNA-Replikation und Zellteilung zeitlich überlappen, erfolgt die Duplikation der DNA eukaryotischer Zellen und die Segregation ihrer Chromosomen streng voneinander getrennt nacheinander. Der Zellzyklus somatischer Zellen der Eukaryoten besteht prinzipiell aus der M-Phase (Mitose) und der Interphase. Die M-Phase ist der Zeitabschnitt, in dem die Chromosomen in ihre Tochter-Chromatiden aufgeteilt werden und die Zellen sich teilen. Die Interphase, der Zeitabschnitt zwischen zwei Mitose-"Runden", teilt sich in die G1-Phase (Intervall zwischen der Mitose und dem Beginn der DNA-Replikation), die S-Phase (DNA-Synthese), und die G2-Phase (Intervall zwischen S-Phase und Mitose) auf (siehe Abb. 1) [Michal (1999)] [Alberts *et al.* (2000)].

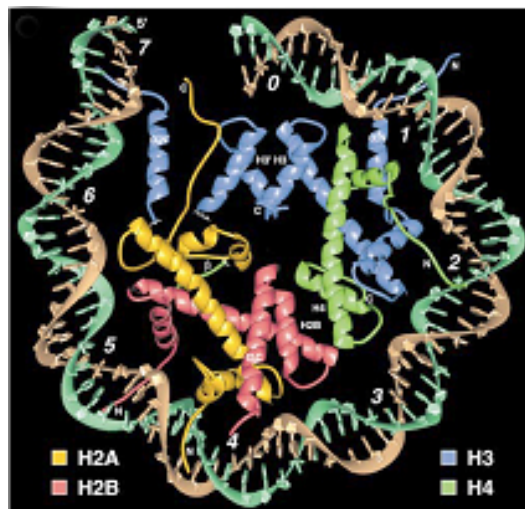


**Abb. 1: Der Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle (Überblick):**

Die **Interphase** des eukaryotischen Zellzyklus ist unterteilt in die **G1-Phase**, die **Synthese-(S)-Phase** (hier wird die DNA dupliziert) und die **G2-Phase**. Die Interphase dauert normalerweise ca 24 Stunden. Nach der Interphase folgt eine **Mitose**, bei der der duplizierte DNA-Satz dann jeweils zur Hälfte auf die entstehenden Tochterzellen verteilt wird. Die Mitose dauert etwa eine Stunde. Die Zellen können aber auch den Zellzyklus verlassen und in die sogenannte **G0-Phase** wechseln. Abbildung verändert nach Lewin, GENES VII [Lewin (2000)].

Zu Beginn der M-Phase ist die Replikation abgeschlossen. Die M-Phase wird typischerweise in 6 Abschnitte unterteilt. Während der Prophase kondensieren die Chromosomen und die mitotische Spindel, die aus Mikrotubuli und Spindelpol-Körpern besteht, bildet sich aus. In der Prometaphase löst sich normalerweise die Kernmembran

auf; bei Hefen allerdings bleibt die Kernmembran während der gesamten Mitose intakt. Spezialisierte Proteinkomplexe („Kinetochore“) lagern sich an die Centromere der Tochter-Chromatiden an. Mittels dieser Komplexe heften sich die Chromosomen an die Mikrotubuli (bei *S. cerevisiae* existiert pro Chromosom nur ein Mikrotubulus). In der Metaphase sind die Chromosomen vollständig kondensiert und sie sammeln sich in einer Ebene, der Metaphase-Platte, in der Mitte zwischen den beiden Spindelpolen. Durch besonderes Signal ausgelöst, werden in der Anaphase die Tochterchromatiden langsam entlang der Mikrotubuli zu den jeweiligen Spindelpolen der Zelle gezogen. In der Telophase erreichen die Tochterchromatiden die Spindelpole. Die Mikrotubuli lösen sich auf und um die Chromosomen bilden sich neue Kernmembranen aus. Bei Hefen kommt es durch Einschnüren der bestehenden Kernmembran zur Bildung von zwei Zellkernen. Die Nukleoli werden nun wieder sichtbar. Die Zytokinese ist der Abschnitt der M-Phase, in dem zwei separate Tochterzellen entstehen. Das Zytoplasma mit den Zellorganellen wird aufgeteilt. Durch eine Taillierung, die genau durch die Mitte der sich teilenden Zelle verläuft, entstehen die zwei Tochterzellen. Bei Hefen trennt sich die neu entstandene Knospe von der Mutterzelle [Alberts *et al.* (2000)].



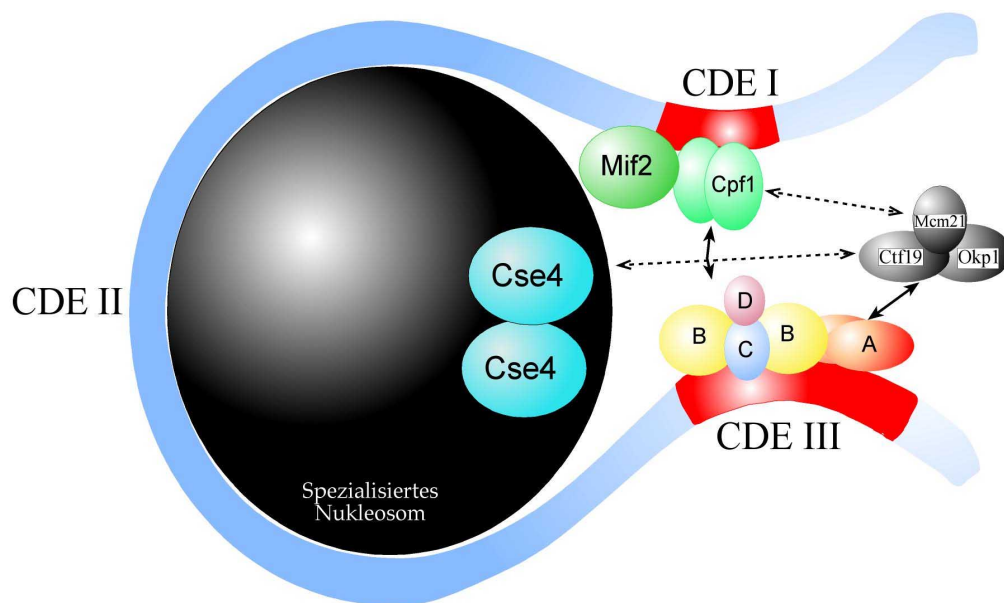
**Abb. 2 Das Nukleosom humaner Zellen:** (gelb Histon H2A, rot, Histon H2B, grün Histon H4 und blau Histon H3). In den Nukleosomen der Centromer-Region ist H3 durch CENP-A ersetzt [Luger *et al.* (1997), Luger *et al.* (1998a), (1998b)].

Eukaryotische Chromosomen und ihre Centromere sind unterschiedlich komplex aufgebaut. Die Centromer-DNAs der Chromosomen menschlicher Zellen sind zwischen 200 kb und 9 Mb lang und bestehen zum großen Teil aus hochrepetitiven Sequenzen [[Alberts *et al.* (2000)] [Jiang *et al.* (1993a)] ]. Bei der Essigfliege *Drosophila melanogaster* ist die Centromer-DNA ca. 400 kb, bei Spalthefen *Schizosaccharomyces pombe* 40 bis 220 kb groß. Demgegenüber ist das Centromer der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit nur 125 bp sehr kurz [Hegemann *et al.* (1993)]. Dies macht *S. cerevisiae* zu einem geeigneten

Modellorganismus für molekularbiologische Untersuchungen an eukaryotischen Centromeren.

## 1.1. Das Kinetochor von *S. cerevisiae*

Die Centromer-DNA der Bäckerhefe ist um ein einziges Nukleosom gewickelt, das an Stelle des Histon-H3 ein Homodimer der H3-Variante Cse4 enthält. Dieses Nukleosom und die dort bindenden Proteine bilden die zentrale Domäne des Kinetochors (siehe Abbildung 3), die mit einer Vielzahl von weiteren Kinetochor-assoziierten und Spindel-„Checkpoint“-Proteinen in Wechselwirkung treten. Der daraus entstehende Multi-Protein-Komplex bildet eine extrem kompakte, funktionelle Chromatin-Region aus, die etwa 150 - 250 bp DNA umfasst [Choo (2001)]. Im Folgenden ist das Kinetochor der Bäckerhefe grob schematisch dargestellt. Die Darstellung dient nur der Vorstellung der Komponenten sowie deren Interaktionen und stellt kein molekulares Modell des Kinetochors dar [Hemmerich *et al.* (2000a)] [Meluh *et al.* (1998)].



**Abb. 3: Der Centromer-Kinetochor-Komplex der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*:**

CDE I besteht aus 10 Basenpaaren. Dort bindet Cpf1 als Homodimer. Das CDE II ist 78-86 bp lang. Hier bindet vermutlich Mif2. CDE III ist etwa 26 bp lang. An der CDE III binden die Proteine Cbf3a, Cbf3b, Cbf3c und Cbf3d als Multiproteinkomplex [Hegemann *et al.* (1993)]. (Genauere Erklärung siehe 1.1.1.)

Das spezialisierte Nukleosom des Centromers enthält an Stelle des Histon-H3 Dimers ein Homodimer des homologen Proteins Cse4 [Hemmerich *et al.* (2000a)] [Meluh *et al.* (1998)].

### 1.1.1. Centromer-DNA

Die Centromer-DNA von *S. cerevisiae* (125 bp) besteht aus den drei konservierten Regionen CDE I, CDE II und CDE III (*centromere determining element*) [Hegemann *et al.* (1993)]. CDE I besteht aus der Consensus-Sequenz dRTCACRTG (R: Purin). Das Protein Cpf1 bindet an CDE I als Homodimer [Cai *et al.* (1990)]. Die Länge von CDE II variiert zwischen 78 und 86 bp. Der dA/dT-Anteil dieser Region ist meist größer als 90 % [Hegemann *et al.* (1988), Hegemann *et al.* (1993)]. Es sind bisher keine Proteine identifiziert worden, die sequenzspezifisch an CDE II binden. CDE III ist etwa 26 bp lang und stellt eine *Consensus*-Sequenz dar (Abb. 1). An CDE III bindet der essenzielle Cbf3-Proteinkomplex, der aus den vier Proteinen Cbf3a, Cbf3b, Cbf3c und Cbf3d besteht [Lechner *et al.* (1991)] (Abb. 1). [Hegemann *et al.* (1993), Lechner *et al.* (1996)].

### 1.1.2. Proteine im Kinetochor der Hefe

#### 1.1.2.1. Der Cbf3-Proteinkomplex

Ein grobes Modell der Architektur des Cbf3-Komplexes konnte durch *in vivo*-Crosslink-Experimente aufgestellt werden [Espelin *et al.* (1997), Meluh *et al.* (1997)]. 56 bp der CDE-III-Region und die drei dort bindenden Proteine Cbf3a, b und c werden als "core-Komplex" definiert [Lechner *et al.* (1996)]. Ein "erweiterter core-Komplex" besteht aus ca. 80 bp DNA; hier binden weitere Cbf3a-Proteine [Espelin *et al.* (1997), Meluh *et al.* (1997)]. Cbf3d bindet nicht direkt an die DNA [Lechner *et al.* (1996)]. Die Proteine des Cbf3-Komplexes sind essenziell: Deletions-Mutanten ihrer Gene sind nicht lebensfähig [Lechner *et al.* (1991)]. Der Cbf3-Komplex spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des mitotischen Zellzyklus [Sorger *et al.* (1995)].

Im aktiven Kinetochor-Komplex sind mindestens 4 **Cbf3a**-Proteine (je 956 Aminosäuren (AS), 112 kD) vorhanden, davon zwei am 26 bp langen CDE-III-"core-Komplex" [Goh *et al.* (1993), Lechner *et al.* (1991)]. Zwei weitere binden an die erweiterte CDE-III Region [Meluh *et al.* (1997)]. Cbf3a bindet an die Mikrotubuli und ist bei der Anheftung der Chromosomen an die Spindel beteiligt. Es ist vermutlich auch für die ATP-abhängige Motorprotein-Aktivität des Cbf3-Komplexes bei der Zellteilung verantwortlich [Goh *et al.* (1993)]. Chromosomen, die am Kinetochor an den Spindel-Mikrotubuli haften, werden

dabei an den Spindelfasern entlang zu den beiden Spindelpolen gezogen [Jiang *et al.* (1993a), Jiang *et al.* (1993b)].

**Cbf3b** (608 AS, 71 kD) bindet direkt an die CEN-DNA. Es ist das einzige Protein des Cbf3-Komplexes mit einer bekannten DNA-Binde-Domäne [Strunnikov *et al.* (1995)]. Der N-Terminus dieses Proteins hat Ähnlichkeit zum Zinkfinger-Motiv des Hefeproteins Gal4 [Lechner (1994)]. Im Zentrum dieses Motivs befindet sich ein binukleärer  $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ -Komplex („Zinkfinger“), der vermutlich an das hochkonservierte dCCG-Triplett in der CDE-III-Region bindet [Sorger *et al.* (1995)]. Außerdem besitzt das Protein eine „coiled coil“-ähnliche Region, die als Heterodimerisierungs-Oberfläche dienen könnte. Aus Crosslink-Studien wird geschlossen, dass Cbf3b als Dimer an die DNA bindet [Meluh *et al.* (1997)].

**Cbf3c** (477AS, 56kD) wird durch Phosphorylierung aktiviert. Die dazu notwendige Kinase wird durch Cbf3d rekrutiert, einem Prozess, an dem auch das Protein Sgt1 beteiligt ist [Kaplan *et al.* (1997)] [Kitagawa *et al.* (1999)]. Cbf3c hat eine kurze biologische Halbwertszeit, es wird *in vivo* sehr schnell in Proteasomen hydrolytisch abgebaut [Kaplan *et al.* (1997)]. Über diesen Mechanismus wird vermutlich eine Verbindung zwischen dem Kinetochor und dem Zellzyklus hergestellt. Diese Kopplung gewährleistet, dass der Cbf3-Komplex nur dann in aktiver Form am Centromer vorliegt, wenn eine Zellteilung stattfindet [Kaplan *et al.* (1997)]. Am N-Terminus von Cbf3c befindet sich eine F-Box-Domäne [Kaplan *et al.* (1997)]. F-Boxen erlauben sequenzspezifische Protein/Protein-Interaktionen [Bai *et al.* (1996)] .

**Cbf3d** (auch „SKP1“; 193 AS, 23 kD) [Lechner *et al.* (1991)] besitzt Homologie zum p19-SKP1-Protein des Menschen, einem Teil des Cyclin-A/Cdk2-Komplexes, welcher an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist [Stemmann *et al.* (1996), Stemmann *et al.* (2002)]. Cbf3d rekrutiert zusammen mit Sgt1 eine Kinase, die durch Phosphorylierung Cbf3c aktiviert [Kaplan *et al.* (1997)] [Kitagawa *et al.* (1999)]. Cbf3d bindet auch an das für den Zellzyklus relevante Cdc4 und leitet damit den Ubiquitin-abhängigen Abbau von Cbf3c ein. Durch diese Kontrolle der Aktivierung und Deaktivierung des essenziellen Cbf3c-Proteins ist Cbf3d wahrscheinlich entscheidend an der Regulation und Kontrolle des Zellzyklus von *S. cerevisiae* beteiligt [Kaplan *et al.* (1997)].



### 1.1.2.2. Weitere Kinetochor-Proteine der Bäckerhefe

**Cpf1 (351 AS, 39 kD)** ist ein „*basic region-Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper*“ (bHLH-Zip)-Protein, das als Homodimer spezifisch an die CDE I des Hefe-Centromers bindet [Cai *et al.* (1990), Wieland *et al.* (2001)].

Dort übt es vermutlich eine größtenteils strukturelle Rolle aus, indem es die DNA stabilisiert und um das Nukleosom herum biegt [Meluh *et al.* (2002)]. Eine weitere Rolle übt das Protein als Transkriptionsfaktor im Synthese-Stoffwechsel der Aminosäure Methionin als Teil des Met4-Cpf1-Met28-Komplexes aus [Kuras *et al.* (1997)] [Hemmerich *et al.* (2000a)]. Auch dort bindet das Protein an eine E-Box [Cai *et al.* (1990)].

**Mif2 ( 549 AS, 62 kD)** ist mit CEN-DNA assoziiert [Meluh *et al.* (1995), (1997)]. Als mögliche DNA-Bindedomäne von Mif2 wurde eine als "AT-Hook" bezeichnete Domäne identifiziert. „AT-Hook-Domänen“ anderer Proteine binden an A/T-reiche DNA [Brown, M. T. *et al.* (1993), Brown, M. T. (1995)]. Es wird vermutet, dass Mif2 über diese Domäne an die CDE-II-Region der CEN-DNA bindet [Meluh *et al.* (1995)].

Der Histonanteil des essenziellen Centromerproteins **Cse4** (228 AS, 27 kD) ist zu 64% identisch mit dem Histonprotein H3 [Stoler *et al.* (1995)]. Cse4 ist Bestandteil eines speziellen Nukleosoms im Chromatin am Centromer [Basrai *et al.* (1995), Meluh *et al.* (1998)]. Die Histon-Faltungs-Domäne von Cse4 besitzt eine große Homologie zum menschlichen Centromer-Protein CENP-A und zu den vergleichbaren Domänen der Centromer-H3-Analoga anderer eukaryotischer Organismen [Stoler *et al.* (1995), Sullivan (2001)]. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ersetzen Homodimere von Cse4 in den Nukleosomen der Centromerregion das Histon H3 [Stoler *et al.* (1995), Sullivan (2001)] . Ein wesentlich längerer, nicht zu H3 homologer N-terminaler Histon-Schwanz von Cse4 erlaubt vielfältige posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierungen und Methylierungen), die eine präzise Regulation des Kinetochors ermöglichen [Meluh *et al.* (1998)] [Stoler *et al.* (1995)].

Das Hefeprotein **Okp1** (405 AS, 47 kD) hat in mehreren Domänen Homologie zu einigen Sequenzbereichen am C-Terminus des humanen Centromer-Proteins CENP-F [Ortiz *et al.* (1999)] [Rattner *et al.* (1993)] . Es ist Bestandteil eines Komplexes am äußeren Bereich des Kinetochors von *S. cerevisiae*, der aus den Proteinen Okp1, Mcm21 und Ctf19 besteht. Dieser interagiert am Kinetochor der Hefe mit dem an der Centromer-Region CDE I

lokalisierten Cpf1-Homodimer, mit dem an der Region CDE III befindlichen Cbf3-Komplex, mit Mif2, mit Cse4 sowie dem Centromer [Ortiz *et al.* (1999)].

Die Funktion des essenziellen Proteins **Sgt1** (395 AS, 45 kD) [Kitagawa *et al.* (1999)] ist es, als Koaktivator mit Skp1 eine noch unbekannte Kinase an Cbf3c zu rekrutieren und diese zu aktivieren. Damit hat auch Sgt1 eine entscheidende Rolle bei der Assemblierung des Cbf3-Komplexes. Eine weitere Funktion hat Sgt1 innerhalb der Ubiquitin-abhängigen Proteindegradation im Komplex Skp1p/Cdc53p/F-Box-Protein und als mitotisches „Check-Point-Protein“ beim G1/S- und beim G2/M-Übergang. Es hat eine große Ähnlichkeit zum humanen hSgt1, welches vermutlich ähnliche Funktionen übernimmt [Kitagawa *et al.* (1999)].

**Bik1** (440AS, 51 kD) lokalisiert in einer zellzyklusabhängigen Form am Spindel-Pol-Körper, dem Hefe-Homolog zum „Mikrotubuli organisierenden Zentrum“ (MTOC) humaner Zellen, sowie in der Mitose an den Spindel-Mikrotubuli [Berlin *et al.* (1990)] [Lin *et al.* (2001)]. Es ist Teil des Anbindungs-Komplexes zwischen den Mikrotubuli und dem Kinetochor, den es stabilisiert [Lin *et al.* (2001)]. Es hat große Homologie zum humanen Protein **CLIP-170** (oder „Restin“), das in menschlichen Zellen vergleichbare Funktionen ausübt [Perez *et al.* (1999)] [Pierre *et al.* (1992)], [Berlin *et al.* (1990)].

Der spezielle Spindel-„checkpoint“ verhindert während der Mitose den Übergang von der Metaphase zur Anaphase, wenn es entweder Defekte im Aufbau der mitotischen Spindel oder wenn ein oder mehrere Chromosomen nicht korrekt in der Metaphase an die Mikrotubuli binden. In höheren Eukaryoten überprüft dieser „Checkpoint“ den korrekten Zusammenbau der Metaphase-Platte [Chen, M. *et al.* (2002), Chen, R. H. *et al.* (1996), Chen, R. H. *et al.* (1998)]. Die Hefe *S. cerevisiae* bildet jedoch keine solche Metaphase-Platte aus [Straight (1997), Straight *et al.* (1997)]. An diesem Checkpoint sind vor allem die BUB-Proteine („*budding uninhibited by benzimidazole*“) **Bub1** (1021 AS, 118 kD) und **Bub3** (341 AS, 38 kD) beteiligt, die als Kinase die MAD-Proteine („*mitotic arrest deficient*“) [Hoyt *et al.* (1996), Hoyt (2001)], besonders die Proteine **Mad1** (749 AS, 88 kD) und **Mad3** (515 AS, 60 kD) und möglicherweise noch weitere Proteine [Rickard, 1990 ; Pierre, 1992] [Rudner *et al.* (1996)]. Zwischen dem „Spindel-Checkpoint“ und dem APC (*anaphase promoting complex*), der die Cohesine (Proteine, welche die Schwesterchromatiden fest aneinander binden) über Ubiquitinierung und nachfolgenden Abbau in Proteasomen entfernt und so den Übergang von der Metaphase zur Anaphase bewirkt, besteht eine negative Rückkopplungs-Verbindung [Meluh *et al.* (2002)]. Erst wenn dieser Block entfernt ist, kann der Zellzyklus fortgesetzt werden [Meluh *et al.* (2002)].

Mutationen in einem der beteiligten Gene führen zu Fehlfunktionen in diesem *Checkpoint*, verbunden mit Zellzyklus-Aberrationen der Zellen und Letalität [Li *et al.* (1991)].

**Ndc80/Hec1** (691AS, 81 KD) ist ein Teil der mitotischen Spindel. Es ist eine Komponente eines Komplexes, der zusätzlich Nuf2p, Spc25p und Spc24p enthält. Das Protein assoziiert direkt mit dem Centromer. Deletions-Varianten können die Schwester-Chromatiden bei der Elongation der Spindel nicht von einander trennen, die Centromere können nicht an die Spindel binden [Wigge *et al.* (2001)]. Außerdem interagiert Ndc80/Hec1 direkt mit der Cohesin-Untereinheit Smc1. Vermutlich ist es daher eine Rolle des Ndc80-Komplexes, die Cohesine an das Centromer zu rekrutieren, was eine Funktion bei der Bindung der Schwester-Chromatiden an einander nahe legt [Meluh *et al.* (2002), Wigge *et al.* (2001)].

**Stu2** (887AS, 101kD ) ist ein essenzielles Kinetochorprotein, das die Dynamik der an die Centromere bindenden Mikrotubuli-Plus-Enden unterstützt [Kosco *et al.* (2001)]. Depletierung von Stu2 führt zu einer Verringerung und zur Verkürzung mitotischer Mikrotubuli, die auch eine verringerte Dynamik aufweisen [Kosco *et al.* (2001)] . Diese Veränderungen führen zu Fehlern bei der Orientierung des Spindelapparates sowie zur verringerten Bindefähigkeit der Mikrotubuli an die Kinetochore. Die Metaphaseplatte kann während der Mitose nicht mehr korrekt aufgebaut werden, es kommt zum Stillstand der Mitose [Kosco *et al.* (2001)].

Die Phospholipase C **Plc1** (869AS, 101kD) assoziiert mit dem Kinetochor durch Interaktion mit Cbf3a und Cbf3b. Deletion von Plc1 führte zum häufigeren Verlust von Minichromosomen bei der Mitose und zu Verzögerungen bei der Zellteilung [Lin *et al.* (2000)].

**Slk19** (821 AS, 95kD) spielt eine wichtige Rolle beim Zusammenbau und bei der Stabilität des Spindelapparats. Das Fehlen von Slk19 führt zu extrem verkürzten mitotischen Spindeln und einer erhöhten Anzahl von so genannten astralen Mikrotubuli, die keine normale Mitose gewährleisten. Zum Überleben benötigen diese Zellen zusätzlich Kar3, ein Motorprotein des Spindelapparats. Das Fehlen beider Proteine führt zum schnellen Zusammenbruch der Spindeln und zum Anhalten in der Mitose [Zeng *et al.* (1999), Zeng *et al.* (2000)].

**Cin8** (1037 AS, 118 kD) ist ein Motorprotein, welches eine Verwandtschaft zu den Kinesinen aufweist. Seine Aufgabe ist zusammen mit Slk19, die Chromosomen an den

mitotischen Spindelapparat zu binden und diesen zu stabilisieren, und dann für die Bewegung der Schwesterchromatiden zu den Spindelpolen zu sorgen [Hoyt *et al.* (1993)]. Untersuchungen zeigen, dass sich beide Proteine konstitutiv am Kinetochor aufhalten [Lechner *et al.* (1991)]. Cin8 hat eine hohe Homologie zum humanen Kinesin HKSP [Hoyt *et al.* (1993), Kitagawa *et al.* (2001)].

**Nuf2** (451 AS, 53 kD) ist bei einigen Eukaryoten wie *S. pombe*, *C. elegans*, *Mensch* und *S. cerevisiae* hoch konserviert [Janke *et al.* (2001), Kitagawa *et al.* (2001), Nabetani *et al.* (2001), Wigge *et al.* (2001)]. Wird dieses Gen ausgeschaltet, kommt es zu Defekten in der Chromosomen-Aufteilung bei der Zellteilung und beim Spindelapparat-„Checkpoint“: Man beobachtet eine Elongation der mitotischen Spindel, aber ohne die dazu gehörige Teilung der Schwester-Chromatiden. Eine Arretierung der Zellen in der Metaphase erfolgt jedoch nicht [Janke *et al.* (2001), Nabetani *et al.* (2001), Wigge *et al.* (2001)]. Nuf2 hat offensichtlich eine entscheidende Funktion bei der Anbindung der Spindel-Mikrotubuli an die Centromere der Chromosomen und auch beim Spindel-„Checkpoint“, der das Funktionieren dieses wichtigen Schritts der Zellteilung überprüft [Janke *et al.* (2001), Nabetani *et al.* (2001), Wigge *et al.* (2001)].

Die Tabelle 1 zeigt eine Übersicht aller bisher untersuchten Hefe-Kinetochor-Proteine.

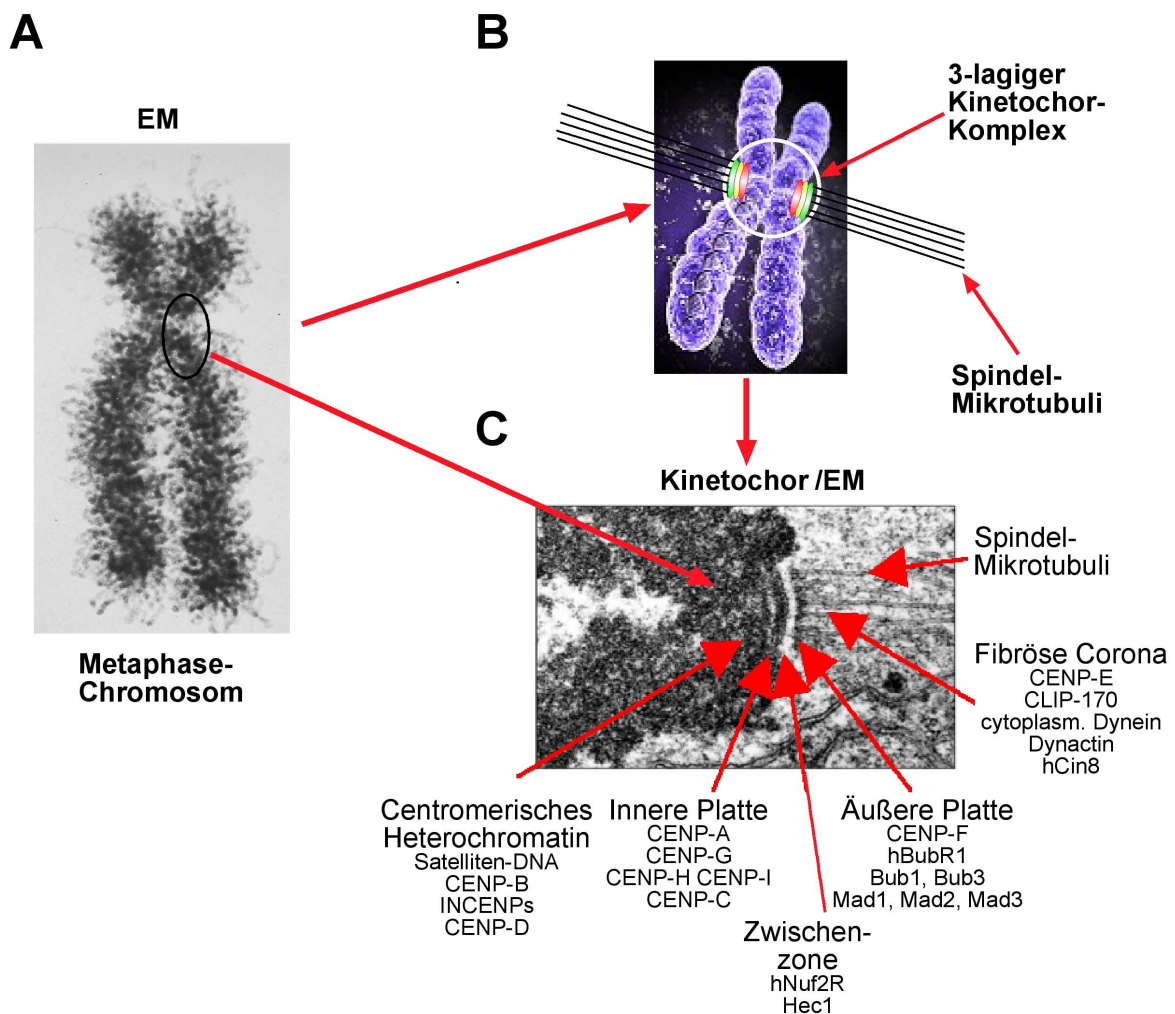
**Tabelle 1:** Auswahl wichtiger Kinetochor-Proteine der Hefe

Die im Rahmen dieser Arbeit näher untersuchten Proteine sind fett gedruckt.

Hefe-Kinetochor-Protein	Größe (kDa)	Lokal./ Funktion	Literaturstelle
<b>Bik1</b>	51	Mikrotubuli	[Lin <i>et al.</i> (2001)]
Bir1	109	Interakt. Cbf3a	[Yoon <i>et al.</i> (1999)]
<b>Bub1</b>	118	Zellzyklus-Kontrolle	[Li <i>et al.</i> (1991)]
Bub2	35	Zellzyklus-Kontrolle	[Hoyt (2001)]
<b>Bub3</b>	38	Zellzyklus-Kontrolle	[Li <i>et al.</i> (1991)]
<b>Cbf3a</b>	112	CDE III	[Goh <i>et al.</i> (1993)]
<b>Cbf3b</b>	71	CDE III	[Strunnikov <i>et al.</i> (1995)]
<b>Cbf3c</b>	56	CDE III	[Kaplan <i>et al.</i> (1997)]
<b>Cbf3d</b>	23	CDE III	[Lechner <i>et al.</i> (1991)]
<b>Cin8</b>	118	Zellzyklus	[Hoyt <i>et al.</i> (1993)]
Cpf1	39	CDE I	[Cai <i>et al.</i> (1990)]
<b>Cse4</b>	27	Nukleosom	[Meluh <i>et al.</i> (1998)]
Ctf19	49	OKp1-Komplex	[Ortiz <i>et al.</i> (1999)]
Kar3	84	Motorprotein	[Hoyt <i>et al.</i> (1993)]
<b>Mad1</b>	88	Zellzyklus-Kontrolle	[Rudner <i>et al.</i> (1996)]
Mad2	47	Zellzyklus-Kontrolle	[Rudner <i>et al.</i> (1996)]
<b>Mad3</b>	60	Zellzyklus-Kontrolle	[Rudner <i>et al.</i> (1996)]
Mcm21	68	Okp1-Komplex	[Ortiz <i>et al.</i> (1999)]
<b>Mif2</b>	62	CDE II	[Meluh <i>et al.</i> (1995)]
Mps1	86	Ser/Thr-Kinase	[Kitagawa <i>et al.</i> (2001)]
Mtw1	52	Kinase-Interaktion	[Kitagawa <i>et al.</i> (2001)]
<b>Ndc80/Hec1</b>	81	Spindel-Checkpoint	[Wigge <i>et al.</i> (2001)]
<b>Nuf2</b>	53	Spindel-Checkpoint	[Nabetani <i>et al.</i> (2001)]
<b>Okp1</b>	47	Okp1-Komplex	[Ortiz <i>et al.</i> (1999)]
<b>Plc1</b>	101	Interakt. Cbf3a, b	[Lin <i>et al.</i> (2000)]
<b>Sgt1</b>	45	Akt. von Cbf3c	[Kitagawa <i>et al.</i> (1999)]
<b>Slk19</b>	95	Spindel	[Zeng <i>et al.</i> (1999)]
<b>Stu2</b>	101	Spindel	[Kosco <i>et al.</i> (2001)]

## 1.2. Der Kinetochor-Komplex des Menschen

Das Kinetochor des Menschen ist im Gegensatz zu dem der Bäckerhefe extrem komplex aufgebaut. Am Centromer wird ein aus mindestens vier makroskopischen Lagen bestehender Proteinkomplex gebildet, der molekular kaum verstanden ist [Choo (1998), (2000), Choo, K. H. A. (1997), Craig *et al.* (1999)]. Dieser besteht aus dem centromerischen Heterochromatin, der inneren Kinetochor-Platte, der äußeren Platte und abschließend der fibrösen Korona (siehe Abbildung 4 C). Einige Proteine sind während des gesamten Zellzyklus und nicht nur während der Mitose in der Nähe des Centromers zu finden. Diese nennt man konstitutive Kinetochor-Proteine. Andere Proteine haben nur Aufgaben bei der Zellteilung. Für diese transient am Kinetochor bindenden Proteine wurde der Name „centromere passenger proteins“ eingeführt [Craig *et al.* (1999)].



**Abb 4: Das Kinetochor der Chromsomen humaner Zellen:** A zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Chromatidenpaares in der Metaphase der Mitose (Bild verändert aus Lewin, Genes VII, [Lewin (2000)]), in B ist ein Modell eines Metaphasen-Chromosoms zu sehen, bei dem die dreilagigen Kinetochor-Komplexe sowie die Spindelmikrotubuli sichtbar sind. C zeigt eine EM-mikroskopische Aufnahme des humanen Kinetochors, bei dem die einzelnen Lagen deutlich zu sehen sind. Die angegebenen Proteine lokalisieren an den angegebenen Positionen (modifiziert und ergänzt nach Alberts et al., Molekularbiologie der Zelle [Alberts et al. (2000)])

### 1.2.1. Das Centromer

Das Centromer des Menschen ist je nach Chromosom zwischen 200 kb und 9 Mb lang [Choo (2000), (2001), Choo, K. H. A. (1997)]. Die DNA besteht vermutlich vollständig aus hoch repetitiven Bereichen von Alpha-Satelliten-DNA, deren sich wiederholende Einheit 171 Basen lang ist [Brown, W. et al. (1995), Catasti et al. (1999), Choo et al. (1987)]. Aus leicht unterschiedlichen Typen dieser Satelliten entstehen dann häufig größere Wiederholungsbereiche von bis zu 6 kb. Diese Struktur mit immer wiederkehrenden kleineren Untereinheiten macht bis jetzt auch eine vollständige Sequenzierung äußerst schwierig [Henikoff (2002)].

### 1.2.2. Die Proteine des Kinetochors humaner Chromosomen

Die Kinetochor-Proteine des Menschen sind an Krankheits-Prozessen beteiligt: Patienten, die an *CREST* (Calcinosis, Raynaud's Syndrom, ösophagischer Unbeweglichkeit, Sklerodaktylie, Telangiektasia), Sklerodermie, entzündlichem Rheuma und speziellen Krebsarten leiden, produzieren in ihrem Blut Autoantikörper gegen bestimmte Kinetochor-Proteine [Ford et al. (1998), Fritzler et al. (1980), Tan et al. (1980)].

**CENP-A** (140 AS, 16 kD, homolog zu Cse4 der Bäckerhefe), ersetzt in den Nukleosomen des Centromers das Histon-H3 [Sullivan et al. (1994)]. Es ist das Signal, das eine Centromer-Region als Aufbaustelle des Kinetochors definiert [Choo (2000), (2001), Sullivan (2001)]. In Chromosomen, deren natürliches Centromer deletiert wurde, bilden sich, ohne dass dort große Areale von  $\alpha$ -Satelliten-DNA benötigt würden, durch den Austausch von Histon H3 gegen CENP-A Neo-Centromere, an denen sich dann ein funktionstüchtiges Kinetochor ausbildet [Choo, K. H. (1997), Choo (2001)] [Saffery et al. (2000)]. CENP-A ist ein Antigen von „Anti-Centromer-Autoantikörpern“ (ACA-Seren) [Fritzler et al. (1980)] im Blut von Patienten die an CREST, Skleroderma, entzündlichem Rheuma, bestimmten Krebsarten und anderen systemischen Autoimmunerkrankungen leiden [Sullivan et al. (1994)].

Während der Mitose wird CENP-A am Beginn der Prophase durch die Aurora-B-Kinase, einem weiteren zeitweiligen Kinetochor-Protein, an der N-terminalen Domäne phosphoryliert. Zu Beginn der Anaphase wird CENP-A dann wieder dephosphoryliert. Dadurch wird dann die Teilung der Schwesterchromatiden eingeleitet [Zeitlin *et al.* (2001a), Zeitlin *et al.* (2001b)].

**CENP-B** (599 AS, 65 kD) interagiert als homodimeres Helix-Loop-Helix-Protein mit einem 17 bp langen Oligo-Nukleotid innerhalb der Alpha-Satelliten-DNA (der „CENP-B-Box“) [Cooke *et al.* (1990), Muro *et al.* (1992), Sullivan *et al.* (1991)]. Es vermag dadurch das Chromatin am Centromer zu stabilisieren. Ein vermutlich zu CENP-B strukturell und in der Funktion homologes Protein in der Bäckerhefe – eine Sequenzhomologie besteht jedoch nicht -- ist Cpf1 [Cai *et al.* (1990)], das als bHLH-zip Protein, ebenfalls als Homodimer, an die E-Box dATCACGTG in der CDE-I-Region des Hefe-Centromers bindet [Kitagawa *et al.* (1995), Kitagawa *et al.* (2001)]. Auch CENP-B ist ein übliches Autoantigen in ACA-Seren [Sullivan, B. *et al.* (2001), Sullivan *et al.* (1991), Yoda *et al.* (1992)].

**CENP-C** (943 AS, 107 kD, homolog zu Mif2 der Bäckerhefe) bindet *in vivo* spezifisch an die CENP-B-Box der  $\alpha$ -Satelliten [Saitoh *et al.* (1992b)] [Politi *et al.* (2002)]. Es bindet an die gleichen Bindestellen wie CENP-B, aber in klar davon getrennten Satelliten-Arealen [Politi *et al.* (2002)]. Auch CENP-C ist ein Autoantigen von ACA-Seren [Fritzler *et al.* (1980), Tan *et al.* (1980), Tan (1988), (1989)]. Die beiden Proteine sorgen damit für eine definierte Substrukturierung der inneren Platte des Kinetochors [Politi *et al.* (2002), Saifitdinova *et al.* (2001), Saitoh *et al.* (1992a)]

**CENP-D** (47-50 kD) wird ebenfalls als Antigen von ACA-Seren mancher CREST-Patienten erkannt. Es wurde in Westernblots detektiert und bindet vermutlich auch an die  $\alpha$ -Satelliten-DNA im Bereich des Centromers [Bischoff *et al.* (1990)]. Die Sequenz von CENP-D ist noch nicht bekannt [Chan, H. L. *et al.* (1994), Ford *et al.* (1998)] [Bischoff *et al.* (1990)].

**CENP-E** (2663 AS, 312 kD) ist ein Bestandteil der äußeren Platte des Kinetochors bzw. der fibrösen Korona, an die die mitotischen Spindel-Mikrotubuli binden [Yen *et al.* (1991), Yen *et al.* (1992)]. CENP-E ist ein sogenanntes "Minus-Ende-dirigierendes" Motor-Protein, das in der Mitose dafür verantwortlich ist, dass die Schwester-Chromatiden in der Anaphase zu den Polen des Spindelapparates gezogen werden und ist dabei sowohl an der Chromatiden-Bewegung wie auch an der Spindelfaser-Elongation beteiligt. An dieser



Funktion von CENP-E sind weitere Motor-Proteine, wie der Dynein/Dynactin-Komplex beteiligt. Das Protein ist daher entscheidend für den Übergang zwischen Metaphase und Anaphase der Mitose.

Man unterscheidet bei den Spindel-Mikrotubuli Plus- und Minus-Enden, wobei sich das Plus-Ende definitionsgemäß am Kinetochor befindet, während das Minus-Ende an den Polen der Spindel lokalisiert ist [Thrower *et al.* (1995), Thrower *et al.* (1996)].

CENP-E wird in der späten G2-Phase des Zellzyklus an das Kinetochor rekrutiert und ist dort bis zur Metaphase der Mitose zu finden. Danach findet man das Protein in der tubulären Mittelplatte und in der Telophase dann im Mittel-Körper ("*midbody*") einem Faserbündel aus Tubulin, das gegen Ende der Mitose zwischen den neu entstehenden Tochnuklei zu detektieren ist. Am Ende der Mitose wird CENP-E proteolytisch abgebaut.

In der Hefe findet man ein zu CENP-E schwach homologes Protein, das Ndc80/Hec1, welches in der Bäckerhefe Teil des Ndc80-Komplexes ist, der aus Ndc80/Hec1, Nuf2, Spc24 und Spc25 besteht und in diesem Organismus ähnliche Funktionen hat [Chan, G. K. *et al.* (1999), Martin-Lluesma *et al.* (2002), Wigge *et al.* (2001), Yen *et al.* (1992)].

**CENP-F** (Mitosin) (3210 AS, 368 kD), ist der größte bekannte Bestandteil des Kinetochors humaner Chromosomen. Das Phosphorprotein ist wie CENP-E ein Centromer-Passagier, Teil der fibrösen Korona der äußeren Kinetochor-Platte und zeigt gleiche Lokalisation im Laufe des Zellzyklus. Es ist in der Mitose am Centromer zu finden, geht dann in den Mittelkörper und wird dann schnell abgebaut. Während der Mitose wird CENP-F hyperphosphoryliert [Liao *et al.* (1995), Zhu *et al.* (1995b)].

Der C-Terminus von CENP-F ist entscheidend für seine Funktion. An ihm befindet sich auch die NLS, das „nukleäre Lokalisationssignal“, im Weiteren die Proteinsequenz, die CENP-F an das Kinetochor binden lässt und eine „*coiled-coil*-Domäne“, die für die Homo- und Heterodimerisierung erforderlich ist [Zhu *et al.* (1995a), Zhu *et al.* (1997)].

Es gibt Beweise, dass CENP-F *in vivo* mit CENP-E und hBUBR-I interagiert [Chan, G. K. *et al.* (1998), Rattner *et al.* (1993)].

In der Bäckerhefe gibt es 2 Proteine, die eine Homologie zu Mitosin aufweisen, zum Einen das „*outer kinetochor protein*“ Okp1 [Ortiz *et al.* (1999)], zum Anderen Slk19 [Sullivan, M. *et al.* (2001), Zeng *et al.* (1999)].

Das konstitutive Centromer-Protein **CENP-G** (95 kD, AS-Sequenz wurde noch nicht aufgeklärt) wurde erst relativ spät als Teil von Antiseren von Patienten, die am GAVE-Syndrom (*gastrische antrale vaskuläre Ektasie*), einer seltenen Form von systemischer

Sklerose, leiden, entdeckt. Es ist ein Teil der inneren Kinetochor-Platte, ragt aber teilweise auch darüber hinaus in die „Zwischenzone“ hinein. Es assoziiert mit dem Alpha-1-Subtyp der Alpha-Satelliten. An inaktiven Centromeren, Neocentromeren sowie an Y-Chromosomen, die keinerlei Alpha-Satelliten besitzen, findet man es jedoch auch. Daher geht man davon aus, dass CENP-G eine essenzielle Rolle beim Aufbau des Centromers spielt, und dass möglicherweise bei Centromeren, die keine Alpha-Satelliten besitzen, weitere Centromer-Proteine dann an CENP-G als Gerüstprotein binden können [He, D. *et al.* (1998)].

Das konstitutive Kinetochor-Protein **CENP-H** (247 AS, 29 kD) ist Teil der inneren Kinetochor-Platte [Sugata *et al.* (1999)] und kolokalisiert sowohl in der Interphase als auch in der Mitose mit CENP-I, CENP-A und CENP-C. CENP-H ist dort aber außerhalb des centromerischen Heterochromatins zu finden. Eine Kolokalisation mit CENP-B erfolgt daher nicht [Nishihashi *et al.* (2002)].

Wie CENP-A und CENP-C findet man CENP-H auch an Neocentromeren (neugebildete Kinetochore auf Nicht- $\alpha$ -Satelliten-DNA von Minichromosomen, deren Centromer deletiert ist), nicht aber an den inaktiven Centromeren stabiler bicentrischer Chromosomen. Mehrere Studien zeigen, dass CENP-H multimerisiert und dass diese Multimere eine wichtige strukturelle Rolle bei der Organisation und Funktion aktiver Kinetochor-Komplexe spielen [Sugata *et al.* (2000)] [Sugata *et al.* (1999)].

**CENP-I** (753 AS, 83 kD) ist ein erst kürzlich identifiziertes konstitutives Centromerprotein von höheren Wirbeltieren, das sich wie CENP-A, -C und -H während des gesamten Zellzyklus am Centromer aufhält. Es ist wahrscheinlich seine Rolle an der inneren Kinetochorplatte, nach der Bildung eines speziellen Nukleosoms mit CENP-A in makromolekularen Komplexen zusammen mit CENP-H, eine Bindestelle für CENP-C und nachfolgend für CENP-G aufzubauen. Das äußere Kinetochor baut vermutlich auf diesem Fundament auf [Nishihashi *et al.* (2002)].

**INCENP** („inner centromere protein“) (919 AS, 106 kD) bindet in der inneren Kinetochor-Platte an das centromerische Heterochromatin [Mackay *et al.* (1993b)]. Es hat verschiedene Funktionen, die zur Stabilität des sich aufbauenden Kinetochors beitragen. Es kolokalisiert dort mit der Aurora-B-Kinase, die wichtige Kinetochor-Komponenten phosphoryliert [Mackay *et al.* (1993a)]. In einigen menschlichen Tumor-Zellen ist INCENP überexprimiert [Adams *et al.* (2000), Adams *et al.* (2001), Vagnarelli *et al.* (2001)].

**hNuf2** (464 AS, 54 kD) ist ein bei allen untersuchten Eukaryoten hoch konserviertes Protein. Das Homolog in der Hefe *S. cerevisiae* ist ScNuf2, ein Teil des Ndc80-Komplexes. hNuf2 hat die Funktion, das Kinetochor während der Teilung der Schwesterchromatiden bei der Mitose an den mitotischen Spindelapparat zu binden.

[Nabetani *et al.* (2001)]. Hierbei interagiert hNuf2 mit den Motorproteinen CENP-E und den Dyneinen. Wird hNuf2 in Zellen depletiert, so kommt es zum Zusammenbruch der mitotischen Spindel, und durch Interaktion mit dem Spindel-Checkpoint zum apoptotischen Zelltod [DeLuca *et al.* (2002)].

**hBub1** („*budding uninhibited by benzimidazole*“) (1085 AS, 122 kD, **hBub3** (328 AS, 37 kDa), (dieses Protein ist zu 90% identisch mit Bub3 der Bäckerhefe), **Mad1** (718 AS, 83 kD) („*mitotic arrest defective*“), sowie **hMad3** (1050AS, 120kD), sind die Proteine des humanen Spindel-Checkpoints. Diese, wie ihr Name zeigt, zunächst in der Bäckerhefe identifizierten Proteine, sind in allen Organismen hoch konserviert [Chan, G. K. *et al.* (1998)]. Sie binden spezifisch an Kinetochore in Zellen, die in der Mitose arretiert wurden. Sie werden außerdem an Kinetochore Zellen gefunden, an denen noch keine Mikrotubuli gebunden haben. Außerdem interagieren diese Proteine physikalisch mit CENP-E, einem Motorprotein der äußeren Kinetochor-Platte. Dies unterstützt vermutlich die Anbindung der Spindeln an das Kinetochor [Chan, G. K. *et al.* (1998), Taylor *et al.* (1998)].

**hSgt1** (644 AS, 73 kD) ist ein zum Hefeprotein gleichen Namens homologes Protein. hSgt1 ist in der Lage, das Hefeprotein in einer Null-Mutante der Bäckerhefe, bei der das Gen für dieses Protein deletiert wurde, funktionell zu ersetzen. Seine Funktion ist ähnlich zu denen des Hefeproteins, in dem es wie sein Interaktionspartner Skp1 Teil der Ubiquitin-ligierenden Komplexe ist, und hier Proteine für den proteolytischen Abbau in Proteasomen markiert. [Kitagawa *et al.* (1999), Sato T. *et al.* (1999)]

Dem humanen *S.-cerevisiae*-Cbf3d/Skp1-Homologen **hSkp1** (176 AS, 19 kD) konnte noch keine spezifische Rolle im humanen Kinetochor-Komplex zugeordnet werden. Vieles spricht jedoch sehr für eine Rolle, die der des Hefe-Skp1 sehr ähnlich ist. Es wird ebenso für die Rekrutierung von Kinasen benötigt, die dann andere Proteine durch Phosphorylierungen aktivieren. Diese Rolle spielt es in Interaktion mit Skp2 als Teil des Cyklin-A-CDK-S-Phase-Kinase-Komplexes, der an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist [Zhang H. *et al.* (1995)]. Das humane Protein ist in der Lage, (wenn das Sgt1 der Hefe vorhanden ist) in Skp1-Null-Mutanten sein Hefe-Homolog zu ersetzen [Cai *et al.* (1990), Kitagawa *et al.* (2001)].

**CLIP-170** („cytoplasmatisches Linker-Protein“) (1427 AS, 161 kD (Restin)) ist ein Vertreter einer Klasse von Proteinen, die sowohl eine cytoplasmatische, als auch eine nukleäre Rolle übernehmen können [Pierre *et al.* (1992)]. Das Protein hat mehrere funktionelle Domänen. Am Amino-Terminus des normalerweise als Homodimer vorkommenden Proteins befinden sich in der sogenannten Kopf-Domäne zwei 57 AS lange Mikrotubuli bindende Abschnitte, die durch Phosphorylierung reguliert werden, im Mittelteil findet man *coiled-coil*-Domänen, die zur Dimerisierung benötigt werden, während der Carboxy-terminale Abschnitt für die Bindung an die Kinetochore von entscheidender Bedeutung ist [Perez *et al.* (1999)]. Diese Domänen sind auch im homologen Protein der Bäckerhefe, Bik1 vorhanden, das dort analoge Funktionen übernimmt [Berlin *et al.* (1990), Lin *et al.* (2001), Pierre *et al.* (1992)].

Wenn keine Zellteilung stattfindet, wird CLIP-170 im Cytoplasma für den Start der Bindung von Organellen und Zell-Bestandteilen wie endozytotischen Vesikeln an Mikrotubuli benötigt. Außerdem hat es dort großen Anteil am ordnungsgemäßen Funktionieren des Golgi-Apparates [Perez *et al.* (1999), Perez *et al.* (2002)]. Wenn sich in der Mitose die Kernmembran auflöst, bindet CLIP-170 an die Plus-Enden der Spindel-Mikrotubuli.

Obwohl CLIP-170 kein Motorprotein ist, sorgen Interaktionen dieses Proteins mit Motorproteinen wie Dynein und Dynactin für die Anbindung der Spindeln an den Kinetochor-Komplex und dann für die Trennung der Schwester-Chromatiden [Dujardin *et al.* (1998), Pierre *et al.* (1992), Pierre *et al.* (1994)]. Eine weitere Funktion hat CLIP-170 vermutlich bei der Kontrolle des Zellzyklus, in dem es eine entscheidende Rolle zwischen dem „Spindel-Checkpoint“ mit den BUB- und MAD-Proteine sowie Mps1 und dem die Anaphase einleitenden Komplex APC einnimmt [Orthaus, Wieland *et al.* (2003), Manuskript in Vorbereitung].

**Hec1** („*highly expressed in cancer*“) (464 AS, 49 kD) ist ein *coiled-coil*-Protein mit hoher Homologie zum Ndc80/Hec1 der Hefe *S. cerevisiae* [Nabetani *et al.* (2001), Wigge *et al.* (2001)]. Die genaue Funktion der beiden Proteine ist noch unbekannt, aber beide sind konstitutiv am Kinetochor zu finden. Mutationen in beiden Genen führt zu fehlerhafter Chromosomen-Aufteilung bei der Mitose. Ausserdem spielt Hec1 eine Rolle bei der Rekrutierung der „Checkpoint“-Proteine Mad1 und Mad2 ans Kinetochor [Martin-Lluesma *et al.* (2002)].

Die folgende Tabelle 2 zeigt eine Auswahl wichtiger humaner Kinetochor-Proteine:

**Tabelle 2: Centromer/Kinetochor-Proteine des Menschen**

<b>CEN-Protein</b>	<b>Größe</b>	<b>Funktion</b>	<b>Referenz</b>
<b>Bub1</b>	120	Spindel-Checkpoint	[Chan, G. K. <i>et al.</i> (1999)]
<b>Bub3</b>	37	Spindel-Checkpoint	[Chan, G. K. <i>et al.</i> (1999)]
<b>BubR1</b>	120	Spindel-Checkpoint	[Chan, G. K. <i>et al.</i> (1999)]
<b>CENP-A</b>	19	Centromer-Nucleosomen	[Sullivan <i>et al.</i> (1994)]
<b>CENP-B</b>	65	Alpha-Satelliten-Bindung	[Cooke <i>et al.</i> (1990)]
<b>CENP-C</b>	107	innere Kinetochor-Platte	[Saitoh <i>et al.</i> (1992a)]
<b>CENP-D</b>	19	innere Kinetochor-Platte	[Bischoff <i>et al.</i> (1990)]
<b>CENP-E</b>	312	Äußere Kinetochor-Platte	[Yen <i>et al.</i> (1991)]
<b>CENP-F</b>	368	äußere Kinetochor-Platte	[Liao <i>et al.</i> (1995)]
<b>CENP-G</b>	95	innere Kinetochor-Platte	[He, D. <i>et al.</i> (1998)]
<b>CENP-H</b>	29	innere Kinetochor-Platte	[Sugata <i>et al.</i> (1999)]
<b>CENP-I</b>	83	innere Kinetochor-Platte	[Nishihashi <i>et al.</i> (2002)]
<b>CLIP-170</b>	161	Mikrotubuli Plus-Enden	[Pierre <i>et al.</i> (1992)]
<b>Ch-Tog</b>	226	Kinetochor	[Kitagawa <i>et al.</i> (2001)]
<b>Hec1</b>	49	Kinetochor	[Nabetani <i>et al.</i> (2001)]
<b>HKSP</b>	116	Kinesin-Spindel	[Kitagawa <i>et al.</i> (2001)]
<b>INCENP</b>	106	Alpha-Satelliten	[Mackay <i>et al.</i> (1993b)]
<b>Mad1</b>	83	Spindel-Checkpoint	[Taylor <i>et al.</i> (1998)]
<b>Mad3</b>	118	Spindel-Checkpoint	[Taylor <i>et al.</i> (1998)]
<b>Nuf2R</b>	54	Mikrotubuli	[Nabetani <i>et al.</i> (2001)]
<b>Sgt1</b>	73	Kinetochor	[Sato T. <i>et al.</i> (1999)]

### 1.3. RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist der Prozess, bei dem kurze 19-21 bp lange Oligonukleotide doppelsträngiger RNA den sequenz-spezifischen Abbau einer zur dsRNA komplementären mRNA bewirken.

Da dieser Vorgang hoch spezifisch die Neusynthese von Proteinen nach der Transkription durch den Abbau von schon transkribierter und gespleißter mRNA verhindert, ist es ein so genanntes „*post transcriptional gene silencing*“, PTGS.

RNAi wird durch eine ATP-abhängige Spaltung der dsRNA in kleine RNA-Stücke, den siRNAs („*small interfering RNAs*“) eingeleitet [Bernstein *et al.* (2001a), Bernstein *et al.* (2001b), Hammond *et al.* (2001)]. Diese Spaltung erfolgt durch das Enzym „*DICER*“, einem Mitglied der RNase-III-Familie von dsRNA-spezifischen Endonukleasen [Berben *et al.* (1990), Bernstein *et al.* (2001a), Bernstein *et al.* (2001b)]. Diese *nativen* siRNA-Duplices, die 5'-Phosphat sowie 3'-Hydroxyl-Termini enthalten, werden dann in einen Proteinkomplex eingebaut.

In diesem RISC („*RNA-induced-silencing-complex*“) genannten Komplex [Hammond *et al.* (2001)] kommt es dann zur erneut ATP-abhängigen Entwindung der doppelsträngigen siRNAs, wodurch ein aktivierter RISC-Komplex entsteht.

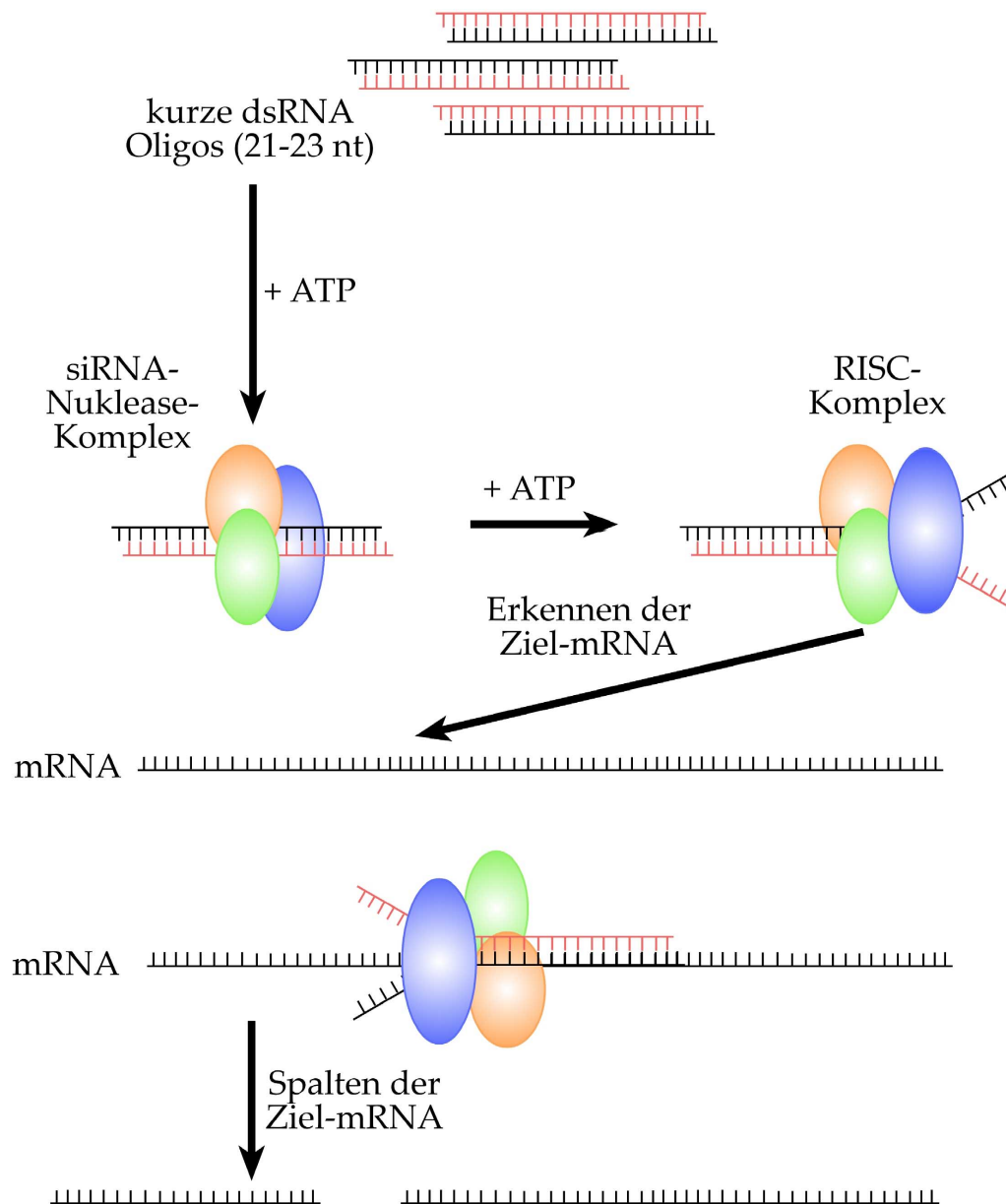
Geführt von dem Antisense-Strang der siRNA erkennt der RISC dann die dazu komplementäre mRNA und spaltet sie hochspezifisch durch enzymatische Hydrolyse. Besonders beeindruckend ist die außerordentliche Effizienz der RNAi. Nur ca. 35 dsRNA Moleküle sind in der Lage, bis zu 1000 Moleküle der Ziel-mRNA zu zerstören [Kennerdell J.R. *et al.* (1998), Kennerdell *et al.* (2002)].

Obwohl RNAi zuerst bei *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurde [Fire A *et al.* (1998)], wurden ähnliche Effekte auch schon bei Pflanzen gefunden [Hammond *et al.* (2001), Sharp (1999)].

Elbashir und Tuschl [Elbashir *et al.* (2001a), Elbashir *et al.* (2001b)] konnten kürzlich zeigen, dass auch ektopisch in Säuger-Zelllinien eingebrachte, synthetisch hergestellte 21 Nukleotide lange dsRNAs hochspezifisch die Neusynthese der Zielproteine verhindern können (siehe Abbildung 5).

Bei dieser Technik wird entweder über direkte Transfektion oder aber durch die Expression von kurzen 21-23 Nukleotiden doppelsträngiger RNA hochspezifisch die Neubildung von Proteinen unterbunden, aus deren c-DNA das zu der RNA-Sequenz komplementäre DNA-Stück stammt. Dies ist eine effiziente, für die Zellen selbst

schonende Methode des „Gen-Knock-Outs“ in lebenden Zellen. Der grundlegende Mechanismus ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt:



**Abb. 5: Mechanismus der RNA-Interferenz:** 19-23 Nukleotide kurze RNA-Duplizes bilden unter ATP-Verbrauch mit speziellen RNAsen von Typ III einen siRNA-Nuklease-Komplex. Unter weiterem ATP-Verbrauch entwindet sich dort die RNA und es entsteht der aktive RISC-Komplex („RNA induced silencing complex“). Dieser erkennt nun hochspezifisch die Ziel-mRNA und spaltet sie. Es kann kein Protein mehr von der Ziel-mRNA abgelesen werden.

## 1.4. Fluoreszierende Proteine

Zur Untersuchung von molekularen Prozessen *in vivo* und *in situ* und um die Lokalisation von ektopisch exprimierten Proteinen in Zellen zu untersuchen, werden häufig Fusionsproteine mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und anderen selbst fluoreszierenden Proteinen verwandt (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Fluoreszierende Proteine:**

Protein	Absorptions-Maximum	Emissions-Maximum
DsRed2	558 nm	583 nm (rot)
EGFP	488 nm	507 nm (grün)
ECFP	433 nm	475 nm (cyan)
EYFP	513 nm	527 nm (gelb)

### 1.4.1. Das grün fluoreszierende Protein GFP und Varianten

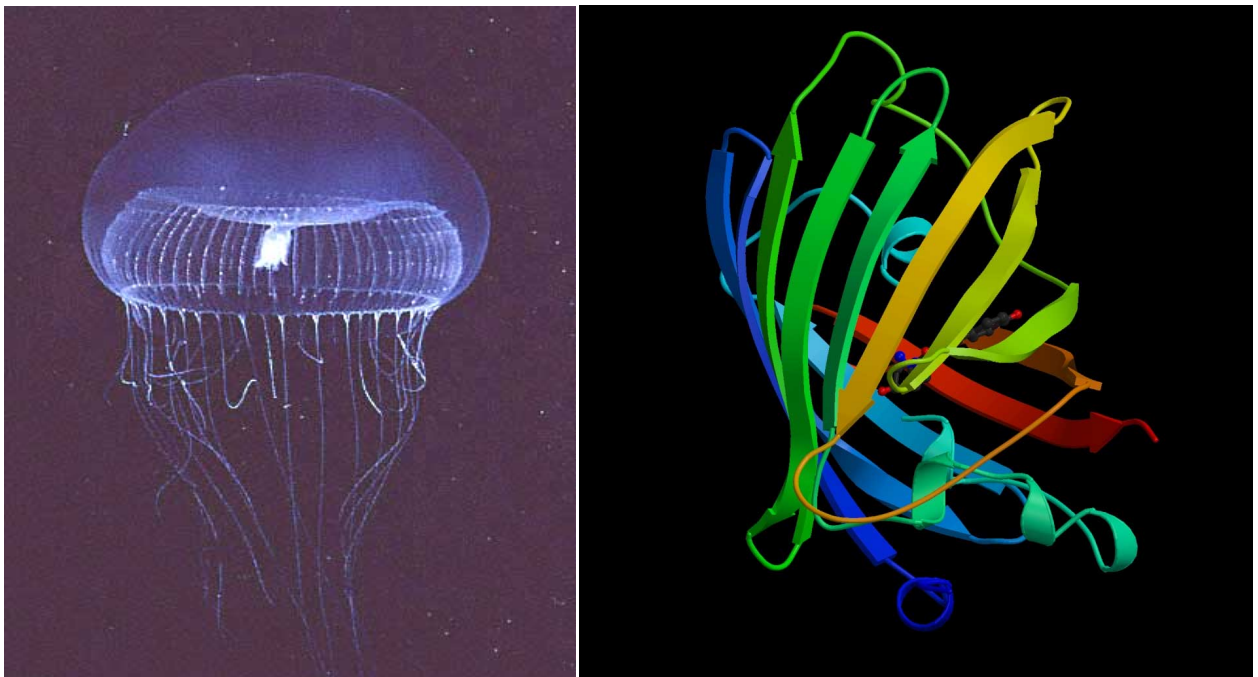
Der Wildtyp des grün fluoreszierenden Proteins GFP („*green fluorescent protein*“) entstammt der nordpazifischen Qualle *Aequorea victoria* und wandelt in diesem Organismus das blaue Licht des chemilumineszenten Proteins *Aequorin*, welches dort Calcium bindet, um. GFP absorbiert natives blaues Licht einer Wellenlänge von 488 nm und emittiert grünes Licht mit einem Maximum von 507 nm was *Aequorea victoria* grün leuchten lässt [Prasher *et al.* (1992)]. Neben der Protein-Struktur sind vor allem die spektralen Eigenschaften und die am gesamten Fluoreszenzprozess beteiligten elektronischen und Konformationszustände ausführlich untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Gens in anderen Organismen ebenfalls fluoreszente Moleküle erzeugt, ohne dass *Aequorea*-spezifische Enzyme erforderlich sind. Durch Mutation bestimmter Aminosäuren konnten die spektralen Eigenschaften von GFP verändert werden.

In der indopazifischen Scheiben-Anemone *Discosoma sp.* wurde ein rot fluoreszierendes Protein von nur ca. 25% Sequenzhomologie zu GFP, aber sehr ähnlicher Struktur entdeckt, welches das Spektrum der verfügbaren fluoreszierenden Proteine erweitert. Die Konstruktion von Chimären bestimmter Proteine mit GFP, seinen Varianten und DsRed findet in Kombination mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden häufige Verwendung



in der Molekular- und Zellbiologie [Spector *et al.* (1997)].

Das „Wildtyp“-GFP und die in dieser Arbeit ausschließlich verwendete Mutante EGFP (F64L, S65T) sind beide 238 Aminosäuren lang und haben ein Molekulargewicht von 27 kD. Das Protein bildet eine Struktur von ca. 3 nm Durchmesser und 4 nm Höhe aus 11  $\beta$ -Strängen sowie zwei  $\alpha$ -Helices unterhalb und einer Helix innerhalb des Zylinders aus, siehe Abb. 6. Der Chromophor ist durch zahlreiche Wasserstoffbrücken geschützt in das Zentrum des  $\beta$ -Fasses eingebettet. Dieser besteht aus dem aromatischen Ring des Tyrosin-Restes 66 und einer zyklischen Struktur, die autokatalytisch aus der Carboxylgruppe von Serin 65 und der Aminogruppe des Glycin 67 entsteht [Elslinger *et al.* (1999)]. Die Mutante EGFP wird gekennzeichnet durch eine effizientere Faltung bei 37 °C, was der Mutation F64L zugeordnet wird, und modifizierte spektroskopische Eigenschaften durch den Einsatz von Thr65. Unter physiologischen Bedingungen liegen sowohl wtGFP als auch EGFP als Monomer vor und sind dann auch sehr stabil gegen Temperatur- und pH-Änderungen, Proteaseaktivität und Detergenzien .



**Abb. 6:** *Aequorea victoria* und Struktur von EGFP

Links ist eine Qualle der Art *Aequorea victoria* zu sehen, rechts ist die Proteinstruktur von EGFP zu sehen: Bänder stellen  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helices dar. Man erkennt ein so genanntes  $\beta$ -Fass, in dessen Mitte das beschriebene Chromophor zu erkennen ist [PDB, 1EMG, [Elslinger *et al.* (1999)]].

## 1.5. Ziel der Arbeit und Arbeitshypothese

Generell wird angenommen, dass grundlegende zellbiologische Prozesse auf molekularer Basis zwischen verschiedenen Spezies evolutiv konserviert sind. Dies scheint aber bei den Kinetochoren von Hefe und Mensch nicht so zu sein. Ein deutlicher Hinweis dafür ist, dass zentrale Proteine der Hefe, die für den Organismus essenziell sind (Cbf3a, b und c), im Menschen ganz fehlen. Dies verwundert umso mehr, da eine Reihe von Proteinen beider Organismen in ihrer Sequenz zueinander homolog sind. Dieser Widerspruch wird in dieser Arbeit aufgegriffen mit dem Ziel, zum Verständnis insbesondere des menschlichen Kinetochors beizutragen.

Während in früheren Arbeiten schon einige menschliche Kinetochor-Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und ihr Verhalten dort studiert wurde, sollte in dieser Arbeit der entgegengesetzte Weg beschritten werden:

Zentrale Kinetochor-Proteine der Hefe sollten mit GFP markiert und in der menschlichen Zelle exprimiert werden. Es wird vermutet, dass mit diesem Ansatz derjenige Teil des menschlichen Kinetochors identifiziert wird, der dem Kinetochor-Aufbau der Hefe ähnlich ist; und umgekehrt auch der zwischen beiden Komplexen vollständig unterschiedliche Teil identifiziert werden kann.

Lokalisations-Studien von GFP-Fusionsvarianten von Hefeproteinen im menschlichen Zellkern dienen hier als Nachweis der Eigenschaft, auch ähnliche Zielstrukturen am Kinetochor zu binden.

Mittels der Technik der RNA-Interferenz kann die Expression der zu Hefe-Kinetochor-Bestandteilen homologen humanen Proteine in der Zelle verhindert werden.

Sind dann homologe Hefe-Proteine in der Lage, die depletierten –„kranken“--Zellen zu „heilen“, kann hiermit auch eine ähnliche Funktion der Protein-Homologen nachgewiesen werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte und technische Ausrüstung

- Agarose-Gel-Kammern BIORAD, Krefeld
- Filme (Röntgen) Kodak Biomax Light-1 EASTMAN KODAK, Rochester, USA
- Heizwasserbad 6A/U3 JULABO, Seelbach
- Kamera / Computer Cybertech CS 1 CYBERTECH, Berlin
- Microcentrifuge filter system 0,22 $\mu$ m SIGMA, DEISENHOFEN
- Mikroskop 1 (CLSM) Zeiss LSM 510 META
- Mikroskop 2 Zeiss Axiovert 135
- Mikroskop 3 Olympus IX-70
- Minigel-Kammer "Mini-PROTEAN II Cell" BIORAD, Krefeld
- PCR-Gefäße: 0,5 ml Eppendorf "safe lock" EPPENDORF, Hamburg
- Pipetten "Pipetman" GILSON, Langenfeld
- QIAquick PCR-Reinigungs-Kit QIAGEN, Hilden
- Qiagen HiSpeed Plasmid Midi Kit QIAGEN, Hilden
- Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 MILLIPORE, Eschborn
- Spektrophotometer UV-1202 SHIMADZU., Duisburg
- Spektrophotometer SpEcord M500 CARL ZEISS, Jena
- Stahlkassetten WOLF, Heidelberg
- Steuergeräte für Elektrophoresen :
  - Power-PAC 3000 BIO-RAD, Krefeld
  - LKB / ECPS 3000/150 PHARMACIA, München
- Thermoblocks:
  - Eppendorf Thermomixer EPPENDORF, Hamburg
  - Techne Dri-Block DB-2A TECHNE, Bielefeld
- Thermocycler Mastercycler gradient EPPENDORF, Hamburg
- Videoprinter 8124 MITSUBISHI Electric, Ratingen
- Waagen: Sartorius analytik SARTORIUS, Göttingen
  - Sartorius laboratory
- Zentrifugen Biofuge 13 HERAEUS Sepatech, Hanau
  - Megafuge 1.0 R

### 2.1.2. Chemikalien

• Agarose Ultra Pure	GIBCO (Life Technologies, Paisley, UK)
• Ammonium-Persulfat	SIGMA, Deisenhofen
• Bacto-Agar	DIFCO, Detroit, USA
• Bacto-Trypton	DIFCO, Detroit, USA
• Borsäure	GATC, Konstanz
• Coomassie brilliant blue R-250	BIORAD, Krefeld
• DEPC-Wasser	STRATAGENE, La Jolla, USA
• dNTPs	MBI Fermentas St.Leon-Rot
• EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	APPLICHEM, Darmstadt
• Ethanol	SIGMA, Deisenhofen
• Ethidiumbromid	SIGMA, Deisenhofen
• Glycerin	MERCK, Darmstadt
• Hefeextrakt	DIFCO, Detroit, USA
• Kochsalz (NaCl)	ROTH, Karlsruhe
• "Loading-Buffer" (6 X)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
• MgCl <sub>2</sub>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
• Phenol	MERCK, Darmstadt
• Phenol / Chloroform-Mischung	ROTH, Karlsruhe
• "Rotiphorese" 2% BiSacrylamid-Lösung	ROTH, Karlsruhe
• "Rotiphorese" 30% Acrylamid-Lösung	ROTH, Karlsruhe
• TEMED	MERCK, Darmstadt
• Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	ROTH, Karlsruhe
• Zymolyase aus <i>Arthrobacter luteus</i>	Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen **MERCK** (Darmstadt), **ROTH** (Karlsruhe) und **SIGMA-ALDRICH**, München, **EPPENDORF** (Hamburg), **INVITROGEN** (USA), **QIAGEN**, Hilden und **PROMEGA**, USA, in p.a. Qualität bezogen. Allgemeine Labormaterialien (Reaktionsgefäße, Handschuhe, Pipettenspitzen, Filter, Glaswaren usw.) wurden von den Firmen **GREINER** (Frickenhäusen), **EPPENDORF** (Hamburg), und **ROTH** (Karlsruhe) und **NUNC** (Mannheim) bezogen.

## 2.2. Materialien für molekular- und zellbiologische Arbeiten

### 2.2.1. DNA-Oligos für PCR-Ansätze

**Tabelle 4:** Aufstellung der für PCR benutzten Oligonukleotide

cDNA/ Protein	DNA- Oligo	DNA-Sequenz des Oligos 5'→3'	Eingefügte Schnittstelle
<i>S.c.</i> <b>Cbf3a</b>	GW 11 GW 12	GAC GGT ACC ATG AGA TCA TCG ATT TTG TTT CTA GAC GGA TCC TCA GTT AGA TAG ATA TAC TAA CAG ACC	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Cbf3b</b>	GW 13 GW14	GAC GTC GAC ATG TTT AAC CGT ACC ACT CAA CTG A GAC GGA TCC TTA GGA AAG TAT GTC AGA AAT GTT A	<i>Sal</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Cbf3c</b>	GW 15 GW16	GAC GGT ACC ATG CCT TCT TTC AAT CCT GTT AGA TTC GAC GGA TCC TTA TAT TAC CAA AAC CTG AGA GAT T	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Cbf3d</b>	GW 17 GW18	GAC GGT ACC ATG GTG ACT TCT AAT GTT GTC CTA G GAC GGA TCC CTA ACG GTC TTC AGC CCA TTC ATT TTC	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Mif2</b>	GW 19 GW 20	GAC GTC GAC ATG GAT TAT ATG AAA TTG GGG CTT AAG GAC CCG CGG TTA CCC AAA AGT GTC AAA CGT ACT G	<i>Sal</i> I <i>Sac</i> II
<i>S.c.</i> <b>Cse4</b>	GW 21 GW 22	GAC GGT ACC ATG TCA AGT AAA CAA CAA TGG GTT AG GAC GGA TCC CTA AAT AAA CTG TCC CCT GAT TCT TC	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Okp1</b>	GW 23 GW24	GAC AAG CTT TGG CAG CTG ATA GAG ATA ATT TTT TAC GAC GGT ACC CTA GTG TAT ATC TTC TTC GGT CTT ATC	<i>Hin</i> D III <i>Kpn</i> I
<i>S.c.</i> <b>Sgt1</b>	GW 27 GW 28	G ACG AAT TCT ATG CCT GTT GAA AAA GAT TT GAC GGT ACC TTA CCA ATG TTT AGG TTC CAT	<i>Eco</i> R I <i>Kpn</i> I
<i>S.c.</i> <b>Slk19</b>	GW 29 GW 30	GAC T GTC GAC ATG AAC GAA GTT CCT ACC AC GAC GGA TCC TTA TTT TTT TTC ATT TTC TAA CAA	<i>Sal</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Plc1</b>	GW 31 GW32	GAC GGT ACC ATG ACT GAA AGT GCT ATA GA GAC GGA TCC CTA TAA AAT TTG TGT ATG AA	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<b>Ndc80</b> <b>Hec1</b>	GW 33 GW34	GAC GGT ACC ATG CAA AGC TCA ACA AGT AC GAC GGA TCC TTA ATT TGT TAC GTT ATG TTC	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Stu2</b>	GW 35 GW 36	G ACG AAT TCT ATG TCA GGA GAA GAA GAA GT GAC T GTC GAC TTA CGT CCT GGT TGT CCC TTC C	<i>Eco</i> R I <i>Sal</i> I
<i>S.c.</i> <b>Bik1</b>	GW 37 GW 38	GAC GGT ACC ATG GAT AGA TAT CAA AGA AA GAC GGA TCC CTA GAA GAA CTG CTG GTT GTC AG	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Cin8</b>	GW 39 GW 40	GAC GGT ACC ATG GTA TGG CCA GAA AGT AA GAC GGA TCC CTA TTC AAT CTT TAA CAT TTT TCT	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Bub1</b>	GW 41 GW 42	GAC GAAT TCT ATG AAT TTA GAT TTA GGT TC GAC GGA TCC CTA AAA TCT CCT TGA CGG TTT CCC	<i>Eco</i> R I <i>Bam</i> H I

<i>S.c.</i> <b>Bub3</b>	GW 43 GW 44	GAC GGT ACC ATG CAG ATA GTA CAA ATT GA GAC GGA TCC TCA GTT CTC ATA GTC AAA TAT TAT	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Mad1</b>	GW 45 GW 46	GAC GGT ACC ATG GAT GTG AGA GCG GCA TT GAC GGA TCC TTA TTT GGC TTG TCG CTG TT	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Mad3</b>	GW 47 GW 48	GAC GGT ACC ATG AAA GCG TAC GCA AAG AA GAC GGA TCC TCA ACG CTG TGG TGG GTA CGA TAT	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<i>S.c.</i> <b>Nuf2</b>	GW 49 GW 50	GAC GGT ACC ATG AGT AGG AAT CAA GAT GT GAC GGA TCC CTA TTG CAT ATA TTC GAG CAT TTC	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> H I
<i>H.s.</i> <b>CENP-A</b>	GW 25/1 GW 26	TTC TCG AGC TAT GGG CCC GCG CCG CCG GAG CCG AA TTC TCG AGC CGA GTC CCT CCT CAA GG	<i>Sac</i> I <i>Xho</i> I

Die für die PCR verwandten Primer wurden von **MWG Biotech**, Ebersberg bezogen.

### 2.2.2. Doppelsträngige RNA-Oligos für RNAi-Versuche

Für RNAi-Experimente wurden doppelsträngige RNA-Moleküle und die jeweiligen Einzelstränge eingesetzt.

**Tabelle 5:** siRNA-Oligos für RNAi-Versuche

Name des Oligos	Sense-RNA 5' → 3'	Antisense-RNA 5' → 3'
CENP-A-1	GCCCCGAGGCCCGAGGAGGUU	CCUCCUCGGGGCCUCGGGCUU
CENP-A-2	CACAGUCGGCGGAGACAAGUU	CUUGUCUCCGCCGACUGUGUU
Lamin A/C	CUGGACUUCCAGAAGAACAAdTdT	UGUUCUUCUGGAAGUCCAGdTdT

Alle Oligos wurden bei der IBA GmbH, Göttingen hergestellt und wurden in PAGE-Experimenten auf ihre Sauberkeit überprüft.

### 2.2.3. Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

Protein	Name	Referenz/Hersteller
<b>Cbf3a</b>	pWJ110	[Jiang <i>et al.</i> (1993b)]
<b>Cbf3b</b>	pJL33	[Lechner (1994)]
<b>Cbf3c</b>	pJL36	[Stemmann <i>et al.</i> (1996)]
<b>Cbf3d</b>	pOS233	[Stemmann <i>et al.</i> (1996)]
<b>Mif2</b>	pMBO27	[Brown, M. T. <i>et al.</i> (1993)]
<b>Cse4</b>	pRB163	[Keith <i>et al.</i> (1999)]
<b>CENP-A</b>	p211	[Sullivan <i>et al.</i> (1994)]
<b>CLIP-170</b>	pCB6-GFP-CLIP-170-full	[Perez <i>et al.</i> (1999)]
-	pCR-2.1-TOPO	INVITROGEN
<b>EGFP</b>	pEGFP-C1	CLONTECH
<b>DsRed</b>	pDsRed2-C1	CLONTECH

### 2.2.4. Antikörper

Tabelle 7: Primäre Antikörper

Name	Spezies	Erhalten von
<b>ACA Serum 508525 (<math>\alpha</math>-CEN)</b>	<i>Homo sapiens</i>	Uni-Klinikum, FSU Jena
<b><math>\alpha</math>-GFP</b>	Maus IgG	Santa Cruz Biotechnologies, USA
<b><math>\alpha</math>-Lamin A/C</b>	Maus-IgM	Santa Cruz Biotechnologies, USA
<b><math>\alpha</math>-<math>\beta</math>-Tubulin</b>	Maus IgM	Sigma-Aldrich, München
<b><math>\alpha</math>-CLIP-170 4D3</b>	Maus IgG	F. Perez, Paris, [Perez <i>et al.</i> (1999)]
<b><math>\alpha</math>-CLIP-170 2D6</b>	Maus IgM	F. Perez, Paris, [Perez <i>et al.</i> (1999)]
<b><math>\alpha</math>-SmB/B'-Proteine) „Ponton“</b>	<i>Homo sapiens</i>	W.M. Keck Autoimmune Center, USA

### 2.2.5. Enzyme

Tabelle 8: Verwendete Enzyme

Name	E.C.-Nummer	Herkunft
Restriktions-Endonukleasen	3.1.21.4	NE Biolabs, USA
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	2.7.7.7	Eppendorf, Hamburg
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	2.7.7.17	Stratagene, USA
T4-DNA-Ligase	6.5.1.1	Life Technologies, USA
Zymolyase	3.2.1.21	Seikagaku Corp., Japan
Meerrettich Peroxidase	1.11.1.7	Amersham Biosciences, USA

### 2.2.6. Zelllinien und Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit kamen folgende Organismen (Bakterien- und Hefestämme) und humane Zelllinien zum Einsatz:

**Tabelle 9:** Organismen, die im Rahmen der Arbeit eingesetzt wurden

Name	Spezies	Genotyp	Herkunft(Referenz)
<b>XL1-Blue</b>	<i>Escherichia coli</i>	recA-(recA1, lac-endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, {F'pro AB, lacI, lacZDM15, Tn10})	[Bullock (1987)]
<b>BL21 (DE3)</b>	<i>E. coli</i>	F-, ompT, hsdSB (rB -mB -) gal dcm (DE3)	[Studier (1986)]
<b>XL10-Gold</b>	<i>E. coli</i>	TetrΔ (mcrA) 183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F'proAB lacI qZ ΔM15 Tn10 (Tetr) Tn5 Amy]	Stratagene, USA
<b>S288C</b>	<i>S. cerevisiae</i>	MATalpha SUC2 mal mel gal2 CUP1 flo1 flo8-1	T. Munder, HKI, Jena
<b>HEp-2</b>	<i>Homo sapiens</i>	HeLa-Variante, Cervix Karzinom	ATCC, USA; Nr. CCL-23



## 2.3. Methoden

### 2.3.1. Allgemeines

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden in einem Sicherheitslabor der Stufe 1 gemäß § 7 des Gesetzes zur Regelung von Fragen der Gentechnik (Gentechnikgesetz) durchgeführt.

Wasser zur Herstellung von Puffern und Medien wurde als Reinstwasser aus einer Millipore®-Anlage eingesetzt. Für Polymerase-Kettenreaktionen, sowie für Gel-Elektrophoresen wurde doppelt destilliertes Wasser verwendet, in dem das Reinstwasser in einer Anlage mit zwei Destillationsstufen zusätzlich gereinigt wurde. Für RNAi-Versuche wurde DEPC behandeltes Reinstwasser verwendet.

Alle Lösungen zum mikrobiologischen und molekularbiologischen Arbeiten wurden durch Filtrieren oder durch Autoklavieren (121° C, 1,4 bar Dampfdruck) sterilisiert.

Alle Abfälle, die DNA oder Bakterien enthielten, wurden ebenfalls autoklaviert.

### 2.3.2. Puffer und Medien

**Puffer 10 x TBE:** (Stammlösung für alle TBE-Puffer):  
121,5 g Tris-Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)  
51,32 g Borsäure  
3,72 g EDTA

mit Reinstwasser (Millipore) auf 1000 ml auffüllen und dann autoklavieren.

**6 x Ladepuffer:**  
0,05 % Bromphenolblau  
0,05% Xylencyanol FF  
30 % Glycerin in *aqua bidest*.

**LB Medium:**  
10g NaCl  
10g Hefeextrakt  
20g Bacto-Trypton  
ad 2 l *aqua bidest*

Nach dem Mischen durch Autoklavieren sterilisieren.

**1% Agarose-Gel:**  
100 ml 1 x TBE  
1 g Agarose, mischen,  
in der Mikrowelle aufkochen,  
auf ca. 50 °C abkühlen lassen

### 2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach Kary Mullis ermöglicht es, DNA-Fragmente in großer Menge zu amplifizieren [Saiki R.K. *et al.* (1985)] [Saiki RK *et al.* (1986)] [Mullis *et al.* (1992)] . In dieser Arbeit wurde standardmäßig folgender Ansatz verwandt:

• DNA-Matrize	1-5 ng
• 5'-Primer (20 pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
• 3'-Primer (20 pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
• dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ l
• MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 $\mu$ l
• 10X Taq-Puffer	5 $\mu$ l
• taq-Polymerase (0,5 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
• aqua bidest	ad 50 $\mu$ l Endvolumen

In einem Thermocycler (Eppendorf mastercycler gradient ) wurde dann folgendes PCR-Programm durchgeführt:

1.	95 °C	30 Sekunden	<b>Denaturierung</b>
2.	50-71° C	30 Sekunden	<b>Hybridisierung</b>
3.	72 °C	1 Minute/kb DNA	<b>Verlängerung</b>
			30-35 Zyklen
4.	4 °C		Pause

(Die Hybridisierungstemperatur wurde der Primerschmelztemperatur angepasst)

Ein 5  $\mu$ l großes Aliquot des PCR-Produkts wurde jeweils in einer Agarose-Gel-Elektrophorese (1% Agarose) überprüft.

### 2.3.4. Plasmid-Isolierung

#### 2.3.4.1. Isolierung kleiner Mengen von Plasmid-DNA

Zur Isolierung kleinerer Mengen von Plasmid-DNA wurde folgendes Protokoll durchgeführt (abgewandelt nach Sambrook, 1989 [Sambrook (1989)]):

1. Tag: Eine Einzelkolonie des Bakteriums wurde in 2 ml LB-Medium (plus Antibiotikum) suspendiert und über Nacht bei 37 °C und unter starkem Schütteln inkubiert.
2. Tag: Aus Bakterien, die in 1,5 ml dieser Suspension enthalten waren, wurde die Plasmid- DNA unter Zuhilfenahme des „Invisorb Spin Plasmid Mini Kits“ (Invitex, Berlin) nach Anweisung des Herstellers isoliert.

Ein Aliquot dieser DNA-Präparation wurde unter der Katalyse der geeigneten Restriktionsendonucleasen „geschnitten“, und die entstandenen Fragmente wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese getrennt und analysiert.

#### 2.3.4.2. Isolierung großer Mengen von Plasmid-DNA

Zur Präparation größerer Mengen an Plasmid DNA wurden 10  $\mu$ l einer Übernachtskultur in 150 ml LB-Medium mit dem für das Plasmid spezifischen Selektions-Antibiotikum eingetragen und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit dem QIAGEN® HiSpeed Plasmid MIDI Kit. Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen [Qiagen AG, Hilden (1997)].

#### 2.3.5. Restriktionsspaltungen von DNA

Zur genaueren Charakterisierung von präparierter Plasmid-DNA oder für Ligationsansätze wurden bestimmte DNAs vor der weiteren Bearbeitung enzymatisch gespalten. Dies erfolgte unter der Katalyse von Restriktions-Endonukleasen (E.C. 3.1.21.4) (NE Biolabs, USA). Der Standardreaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen: x  $\mu$ g Plasmid DNA werden in einem Volumen von 10  $\mu$ l des vom Hersteller vorgeschriebenen Puffers mit x Units des Restriktionsenzym bei der vorgeschriebenen Temperatur (meist 37 °C) für 1 Stunde inkubiert. In präparativen Ansätzen wurde nach einer Stunde die gleiche Menge an Enzym zugegeben, um eine vollständige Spaltung zu erreichen. Nach weiteren 2 Stunden konnte ein Aliquot des Ansatzes auf einem 1% Agarose-Gel (Puffer 1x TBE) überprüft werden.

##### 2.3.5.1. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten wurde die analytische Agarose-Gelelektrophorese benutzt.

Je nach Größe des zu erwartenden Fragments konnten die Agarose-Konzentrationen von 0,8 bis 2 % variiert werden. Die eingewogene Agarose wurde mit der jeweiligen Menge 1 x TBE-Puffer vermischt, kurz aufgekocht und gelöst. Nachdem das Gel vollständig erstarrt war, wurde der Kamm entfernt und die DNA-Proben konnten im Verhältnis 1:5 mit 6 x Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert werden. Als Kontrolle wurde zusätzlich auf einer Bahn 0,5  $\mu$ g 1 kb-DNA-Leiter (MBI Fermentas, Litauen) mit

aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Das Gel wurde danach aus der Gel-Kammer genommen und in einem Färbebad für 10 min mit Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, München) gefärbt. Danach wurde das Gel bei 312 nm UV-Licht auf einem Transilluminator photographiert.

### **2.3.6. Isolierung von DNA-Fragmenten**

Bei der präparativen Gewinnung von DNA wurden mit Restriktionsenzymen gespaltene DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die mit Ethidiumbromid angefärbten Gelbanden konnten dann auf dem UV-Transilluminator bei 312 nm sichtbar gemacht und mit einem sterilem Skalpell ausgeschnitten werden. Aus den Agarose-Stücken, welche Fragmente richtiger Länge enthielten, wurde die DNA mit dem „MinElute Gel Extraction Kit“ (Qiagen AG, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert und gereinigt.

### **2.3.7. DNA-Konzentration**

Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch als Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine "OD(260 nm)"-Einheit (OD = Optische Dichte) doppelsträngiger DNA entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml [Sambrook (1989)].

Um die Reinheit der DNA zu überprüfen, konnte zusätzlich ein UV-Spektrum zwischen 200 und 300 nm bestimmt werden.

### **2.3.8. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen und die Abschätzung ihrer Reinheit ist mit Hilfe der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) möglich. Wenn nicht anders angegeben, kamen 15%-ige Gele zum Einsatz, wobei die Elektrophorese in einer Bio-Rad-Minigelapparatur (Bio-Rad Laboratories, USA), für ca. 2 h bei 30 mA pro Gel durchgeführt wurde. Dabei kam das von Laemmli [Laemmli (1970)] entwickelte Puffersystem zur Anwendung.

Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden diese mit ca. 20% (v/v) 6X-Proteinprobenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Folgende Puffer und Gelzusammensetzungen kamen zum Einsatz:

**Tabelle 10:** Verwendete Gelzusammensetzungen und Lösungen

<b>Trenngel (15 %)</b>	<b>Sammelgel:</b>	<b>Laufpuffer: 10 x SDS - PAGE</b>	<b>SDS-Probenpuffer:</b>
10,0 ml Acrylamid (30%)	1,7 ml 30% Acrylamid	30,2 g Tris-Base	60 mM Tris-HCl,
0,87 ml Bisacrylamid-St. (2%)	0,7 ml 2% Bisacrylamid	144,0 g Glycin	2 % SDS,
7,50 ml Tris, pH 8,71 (1M)	1,25ml 1M Tris, pH 6,9	10,0 g SDS	25 % Glycerin
0,10 ml SDS (20%)	50 µl 20 % SDS	ad 1 l <i>aqua bidest.</i>	0,1% Bromphenolblau
1,57 ml <i>aqua bidest.</i>	6,35 µl <i>aqua bidest.</i>	pH: 8,7	35 mM Dithiothreitol
16,7 µl TEMED	25 µl TEMED		pH 6,8
66,7 µl APS (10% Lsg.)	50 µl APS (10% Lsg.)		

### 2.3.8.1. Coomassie-Brillant-Blue-Proteinfärbung

Mit der Coomassie-Proteinfärbung lassen sich bis zu 50 ng Protein pro Bande nachweisen. Nach SDS-PAGE wurden die Proteingele auf einem Taumler für mindestens 1 h in der Färbelösung geschwenkt. Der Entfärbevorgang erfolgte unter mehrfachem Wechsel des Entfärbeades. Nach ca. 2 h waren die Gele gut entfärbt und konnten ausgewertet werden. Zur Dokumentierung der Ergebnisse wurden die Gele nach Äquilibration in Trockenlösung zwischen zwei Cellophanfolien (Novex, San Diego) getrocknet.

**Tabelle 11:** Lösungen für die Coomassie-Färbung

<b>Coomassie Brilliant blue R-250 Färbelösung:</b>		<b>Entfärbe-Lösung</b>	<b>Trockenlösung für PAGE-Gele:</b>
50% (v/v)	Methanol	600 ml Methanol	40% (v/v) Ethanol
10% (v/v)	Essigsäure	200 ml Essigsäure	5% (v/v) Glyzerin
0,1% (w/v)	Coomassie Brilliant blue R-250	ad 2l <i>aqua bidest.</i>	

### 2.3.9. Genomische DNA der Bäckerhefe

Die genomische DNA der Bäckerhefe wurde von Dr. T. Munder (HKI, Jena) erhalten oder am HKI, Jena im Labor von Dr. Eck selbst hergestellt. Die Präparation der genomischen Hefe-DNA erfolgte hierbei nach einem Protokoll nach Sambrook und Maniatis [Sambrook (1989)]. Dabei wurden 10 ml YPD-Medium mit einer Kolonie des „Bäckerhefe-Wildtyp-

Stamms“ S288C beimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Die gesamte Kultur wurde bei 4 °C für 5 min bei 4800 U/min abzentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde mehrfach in 20 ml 0,9 M NaCl in destilliertem Wasser gewaschen.

Das Lysieren der Hefe-Zellwand erfolgte, indem das Pellet in 20 ml 0,9 M NaCl-Lösung, die 0,5 g/ml Zymolyase enthielt, resuspendiert und für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt wurde. Die entstandenen Hefe-Protoplasten wurden dann im Mikroskop überprüft. Die zellwandlosen Hefezellen wurden erneut durch Zentrifugieren bei 2500 U/min (5 min) pelletiert und wiederum mehrfach in 0,9 M NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugieren wurden die Zellen vorsichtig in 10 ml eines Puffers aufgenommen, der 0,05 M Tris/HCl (pH 8,0) 0,05 M EDTA und 1% SDS enthielt. Dieser löst die Zellmembran der Hefe-Zellen auf (Wasserbad bei 68 °C, 10 min). Als nächster Schritt folgte die Entfernung der zellulären Proteine durch eine Phenol-Fällung (1 Volumen Phenol zu der Zellsuspension), der zwei weitere Phenol/Chloroform-Extraktionen folgten.

Die nun resultierende wässrige Lösung wurde vorsichtig mit 0,1 Volumen 3M Natrium-Acetat (pH 7,0) vermengt und die genomische DNA wurde durch Zugabe von 2 Volumen 99,8 % Ethanol gefällt. Zur vollständigen Fällung wurde dieses Gemisch über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Die DNA konnte dann abzentrifugiert werden und wurde zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris and 1 mM EDTA) aufgenommen und stand als DNA-Matrize für die PCR-Reaktionen zur Verfügung.

### 2.3.10. Konstruktion von GFP-Fusionsvektoren

Zur Klonierung von GFP-Fusions-Proteinen wurden 13 cDNAs von Hefe-Kinetochor-Proteinen ausgewählt (siehe Tabelle 12). Die Gene für die Proteine standen entweder auf Plasmiden zur Verfügung, die aus anderen Laboren erhalten wurden, oder sie wurden durch Amplifizierung mittels PCR direkt aus genomischer Hefe-DNA der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* selbst (IMB-Jena) hergestellt.

**Tabelle 12:** Im Rahmen dieser Arbeit klonierte Kinetochor-Proteine der Bäckerhefe mit Angabe der Länge der jeweiligen cDNA (in alphabetischer Reihenfolge)

Hefe-Kinetochor-Protein	Länge der cDNA (bp)
Bik1	1323
Cbf 3a	2868
Cbf 3b	1824
Cbf 3c	1431
Cbf 3d	579
Cse4	687
Mif2,	1647
Ndc-80/Hec1	2076
Nuf2	1356
Okp1	1218
Sgt1	1188
Slk 19	2466
Stu2	2667

Die cDNAs für die Proteine Cbf3a (Plasmid pWJ110) [Jiang *et al.* (1993b)], Cbf3b (Plasmid pJL33) [Lechner (1994)], Cbf3c (Plasmid pJL36) [Stemmann *et al.* (1996)] and Cbf3d (Plasmid pOS233) [Stemmann *et al.* (1996)] wurden von Prof. J. Lechner (Universität Heidelberg), Mif2 (Plasmid pMBO27) von Prof. M. Brown [Brown, M. T. *et al.* (1993)] (*Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA*) und Cse4 (Plasmid pRB163) [Keith *et al.* (1999)] von Prof. R. Baker (*Worcester, University of Mass., USA*, Prof. J. Hegemann, Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

Diese Plasmide wurden in XL1-blue *E. coli* Bakterien (Stratagene, USA) eintransformiert. Die transformierten Bakterien wuchsen bei 37 °C in LB-Medium [Sambrook (1989)], dem, entsprechend dem Resistenzgen auf den Plasmiden, 50 µg/ml des Antibiotikums Kanamycin oder 100 µg/ml Ampizillin zugefügt wurden.

Die Plasmid-DNA wurde aufgereinigt. Dazu wurde das „HiSpeed Plasmid Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers verwendet.

Die gereinigten Plasmid-DNAs dienten nun als Matrize für PCR-Reaktionen zur Amplifikation der gewünschten cDNAs.

Die PCR-Primer-Paare wurden bei der MWG Biotech AG (Ebersberg) angefertigt

Die Sequenz und die eingeführten Schnittstellen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Die eingeführten Restriktions-Schnittstellen dienten zur Klonierung der cDNAs in den Vektor pEGFP-C1 (Clontech, USA) in der korrekten Orientierung. Dazu wurden pro Protein jeweils zwei verschiedene, nur einmal im Vektor in der multiplen Klonierungsstelle MCS vorkommende Enzym-Schnittstellen in die Primer eingebaut. Wenn man nun die Vektoren unter Katalyse dieser Enzyme aufschneidet, so kann dann ein so konstruiertes PCR-Produkt nur in der „richtigen“ Orientierung kloniert werden.

Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem, hier nur kurz erläuterten, Protokoll durchgeführt (siehe 2.2.3. PCR): 30-35 Zyklen bei den Temperaturschritten 30 s bei 95 °C, 30s bei 55-65 °C und 1 min bei 72 °C pro Kilobase der Ziel-DNA mit 15 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 8.3 als Puffersystem, 10 mM der dNTPs, unter der Katalyse von 5 Units/μl *Taq* (*thermus aquaticus*) DNA Polymerase (Eppendorf, Hamburg) gemischt mit einem Unit/μl *Pfu* (*pyrococcus furiosus*) DNA Polymerase (Stratagene, USA), 20 pMol von jedem PCR-Primer und zwischen 1 to 150 ng der Matrizen-DNA.

Die *Pfu*-Polymerase ist eine Polymerase, die im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase, eine 3'-5'-Exonuklease Funktion besitzt. Dadurch ist sie in der Lage, Fehlpaarungen bei den Verdopplungs-Schritten wieder zu korrigieren.

Die korrekten Größen der erhaltenen PCR-Produkte wurde in einer Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert. Alle PCR-Produkte wurden dann mit dem „QIA-Quick-PCR-Purification-Kit“ (Qiagen, Hilden) der Anweisungen des Herstellers entsprechend nachgereinigt und nochmals im Gel überprüft. Die nun gereinigt vorliegenden cDNAs standen nur zur „Zwischenklonierung“ in den pCR-2.1-TOPO Vektor (Invitrogen, USA) zur Verfügung. Die Gründe dafür waren, dass sich der Vektor einerseits gut für die Sequenzanalyse eignete, weil er, im Gegensatz zu pEGFP-C1 die (Standard)-M13-Primer zuließ. Außerdem ließ sich die cDNA in diesem Vektor beliebig vermehren. Damit stand immer ein Ausgangsplasmid für die weitere Klonierung in andere Vektoren zur Verfügung.

Das Plasmid pCR-2.1-TOPO (Invitrogen, USA) liegt in linearisierter Form vor. An jedem Ende des „aktivierten“ Plasmids ist an ein 3'-terminales Thymidin (T) kovalent ein Molekül der Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus angebunden. Die Phospho-Tyrosyl-Bindung zwischen dem TOPO-Vektor und der Topoisomerase kann nun von dem 5'-Hydroxyl-Ende des PCR-Produkts angegriffen werden, was zum Abspalten des Enzyms bei gleichzeitigem kovalenten Bindungsaufbau mit dem PCR-Produkt führt. Das für die



Bindung nötige überhängende Adenin (A) wird bei der PCR unter Katalyse von *Taq*-DNA-Polymerase automatisch angehängt.

Die PCR-Produkte wurden nun unter Verwendung des TOPO-TA-Cloning-Kit (Invitrogen, USA) nach Herstellerangaben in den pCR2.1-TOPO (Invitrogen, USA) einkloniert. Die erhaltenen Plasmide mit den inserierten Kinetochorproteinen der Bäckerhefe wurden dann in XL1-blue-Bakterien (Stratagene, USA) transformiert. Nach kurzem Wachstum von zwei Stunden bei 37 °C in SOC-Medium (Invitrogen, USA) wurden die Bakterien auf Agar-Platten ausplattiert, die mit dem Antibiotikum Kanamycin (50 µg/ml) versetzt waren. Durch den Zusatz des Antibiotikums können nun nur die Bakterien wachsen, die den TOPO-Vektor mit eingefügtem Hefe-Gen enthalten. Nach Wachstum der Bakterien bei 37 °C über Nacht, wurden Agarplatten mit Einzelkolonien erhalten.

Von diesen wurden einzelne Kolonien „gepickt“, in 2 ml LB-Medium (Kanamycin (50 µg/ml)) überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Plasmid-DNA dieser „Übernacht-Kulturen“ wurde nun unter Zuhilfenahme des „Invisorb Spin Plasmid Mini Kit“ (Invitek, Berlin) nach Herstellerangaben extrahiert und nachfolgend aufgereinigt.

Das Plasmid pCR2.1-TOPO enthält auf beiden Seiten seiner MCS eine Schnittstelle für die Restriktions-Endonuklease *Eco* R I. Daher wurden die gereinigten Plasmide für eine Stunde bei 37 °C mit *Eco* R I (NE BioLabs, USA) „verdaut“ und die entstehenden DNA-Stücke durch Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert. Ob ein DNA-Stück einkloniert wurde, das der korrekten Länge der gewünschten Hefe-cDNA entsprach wurde durch Vergleich mit einem DNA-Größenstandard (1kb „DNA-ladder“, Fermentas, Vilnius, Litauen) eruiert, der mit auf das Gel aufgetragen wurde.

Von Klonen, die DNA der richtigen Länge enthielten, wurde dann ein Aliquot als Inokulum für eine weitere, jetzt mit 150 ml (LB-Medium mit 50 µg Kanamycin/ml) deutlich größere, Übernachtskultur eingesetzt.

Die Plasmid-DNA dieser Bakterien wurde dann mit dem „HiSpeed Plasmid Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) extrahiert. Man erhält dabei jeweils 500 µl Plasmidlösung, die in etwa 2 µg/µl DNA enthält. Nun konnte die genaue Basen-Sequenz der erhaltenen DNAs durch Sequenzierung nach *Sanger* erhalten werden. Die Sequenzierungen wurden dabei durch die MWG Biotech AG (Ebersberg) unter Verwendung der M13 *reverse* and *forward* Primer (TOPO TA Cloning, Invitrogen, USA) durchgeführt.

Um die cDNA in das pEGFP-C1 Plasmid (Clontech, USA) einzuklonieren, mussten sie aus dem pCR-2.1-TOPO ausgeschnitten und in den vorher linearisierten pEGFP-C1 eingesetzt werden. Die TOPO-Vektoren und das pEGFP-C1 Plasmid wurden daher beide einem

„Doppelverdau“ mit dem selben Paar an Restriktions-Endonukleasen (NE Biolabs, USA) unterzogen, wobei die Schnittstellen, die durch die Primer eingeführt wurden (siehe Tabelle 3) benutzt wurden.

Die DNA-Fragmente aus den Restriktions-Reaktionen des TOPO-Vektors und des pEGFP wurden nun durch eine präparative Agarose-Gel-Elektrophorese (0,8 % Agarose) aufgetrennt. Die Agarose-Stücke, welche Fragmente richtiger Länge enthielten, wurden ausgeschnitten und die DNA daraus mit dem „MinElute Gel Extraction Kit“ (Qiagen AG, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert und gereinigt.

Die cDNAs und das linearisierte pEGFP-Plasmid wurden nun unter der Katalyse von 1 Unit/ $\mu$ l T4 DNA-Ligase (GIBCO BRL, USA) ligiert mit 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% Polyethyleneglykol-8000 als Puffersystem nach Angaben des Herstellers des Enzyms (30 min bei Raumtemperatur, oder bei 16 °C über Nacht).

Die nun in den pEGFP-C1 (Clontech, USA) einklonierten cDNA der Hefe-Kinetochor-Proteine wurden dann in *XL1-blue*-Bakterien transformiert.

Am nächsten Tag folgte auch bei diesen Klonen eine Plasmid-Mini-Präparation, um positive Klone zu erhalten (siehe TOPO-Klonierung).

Letztendlich positive Klone wurden wiederum in 150 ml Kulturen vermehrt und die enthaltenen Plasmide wurden mit dem „HiSpeed Plasmid Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) extrahiert und gereinigt. Diese Fusions-Plasmide wurden nun zur Transfektion in menschlicher HEP-2-Zellen benutzt.

Die cDNAs der Kinetochor-Proteine aus *S. cerevisiae*, die nicht auf Plasmiden zur Verfügung stand (Okp1, Bik1, Nuf2, Sgt1, Slk19, Stu2, Ndc80-Hec1 und Cse4 nochmals zur Kontrolle) wurden durch Amplifikation der Gene aus genomischer DNA der Bäckerhefe mittels PCR hergestellt.

Die Primer für die spezifische Amplifizierung der Gene der gewünschten Hefe-Proteine durch PCR wurden an Hand von Sequenzdaten hergestellt, die im Internet aus dem komplett sequenzierten *S.-cerevisiae*-Genom in der „*Saccharomyces cerevisiae* Genome Database SGD“ an der Stanford University, USA (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) oder in der „SWISS PROT Protein Datenbank“ (<http://us.expasy.org/sprot/>) veröffentlicht und frei zugänglich sind.

Auch die PCR-Primer-Paare für die Klonierung der Hefe-Protein-Gene von Okp1, Sgt1, Slk19, Ndc80-Hec1, Stu2, Bik1, Nuf2, Plc1, Cin8, Bub1, Bub3, Mad1 und Mad 3 wurden

bei der MWG-Biotech AG (Ebersberg) angefertigt. Die Sequenz und die eingeführten Schnittstellen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Als Kontrolle dieser Methode der Herstellung der cDNAs der Hefe-Kinetochor-Fusions-Proteine wurde die Klonierung von **Cse4** nach beiden Methoden durchgeführt (Primer-Sequenz: Tab. 4).

Die PCR Reaktionen wurden dann unter Verwendung der oben genannten Primer und der genomischen Hefe-DNA als Matrize durchgeführt, wie schon oben für die Plasmid-basierenden Proteine beschrieben.

### 2.3.11. CENP-A

Die cDNA für die Histon-H3-Variante CENP-A des Centromers humaner Chromosomen ist auf dem Plasmid p211 ([Sullivan *et al.* (1994)]) kodiert, das aus dem Labor von K.F. Sullivan (Scripps Institute, La Jolla, USA) erhalten wurde. Die Prozedur, die cDNA in den pEGFP-C1- und den pDsRed2-C1-Vektor (Clontech, USA) einzufügen, war identisch zu der, die schon für die, auf Plasmiden basierenden Hefe-Kinetochor-Proteine ausführlich beschrieben wurde.

Die Sequenz und die eingeführten Schnittstellen der Primer für CENP-A sind Tabelle 3 zu entnehmen (Bestellt bei MWG Biotech AG (Ebersberg)).

Parallel konnte ein pEGFP-CENP-A-Plasmid (pEGFP-AF8, [Sugimoto *et al.* (2000)]) aus dem Labor von K. Sugimoto (Osaka Prefecture University, Sakai, Japan) erhalten werden. Beide EGFP-Fusions-Plasmide wurden bei der MWG Biotech AG (Ebersberg) sequenziert, stellten sich als identisch heraus, und konnten beide im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt werden.

### 2.3.12. Zellkultur

Zur Überprüfung der Lokalisation ektopisch eingebrachter Proteine und des erhaltenen Phänotyps nach Transfektion wurde eine humane Zelllinie verwendet.

Dabei handelte es sich um die Zelllinie **HEp-2** (*American Type Culture Collection, Rockville, USA* (ATCC) Nr. CCL-23, eine humane epitheliale Cervix-Karzinom-Zelllinie), einem Derivat der bekannten HeLa-Zelllinie (ATCC Nr. CCL-2), die sich durch besonders große Zellkerne auszeichnet.

Diese Epithel-Zellen wachsen adhärent in einer Einzelschicht auch auf nichtbiologischen Oberflächen, wie Kulturschalen oder Glas und sind daher für zellbiologische Untersuchungen von nukleären Proteinen sehr gut geeignet.

Kultiviert wurden die HEp-2-Zellen in DMEM-Zellkultur-Medium (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*, SIGMA), das 10% fötales Kälber-Serum (FCS) enthielt, in einem Brutschrank bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt der Atmosphäre von 7,5%.

Die Zellen wuchsen standardmäßig bis zur Subkonfluenz, dem Zustand kurz vor Erreichen einer geschlossenen Einzelschicht auf der zur Verfügung stehenden Fläche. Wenn dieser Zustand erreicht war (ca. zweimal pro Woche), wurden die Zellen umgesetzt. Dabei wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dann 2 Mal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen durch eine Inkubation mit einem Gemisch aus Trypsin und EDTA für 5 Minuten bei 37 °C von der Oberfläche abgelöst. Nach Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von DMEM/10% FCS wurden die Zellen in einer Zentrifuge sedimentiert (3 min bei 2000 U/min (RT)). Nach Resuspension des Zellpellets in frischem Kulturmedium wurde ein kleiner Teil dieser Suspension für die weitere Kultivierung in Kulturflaschen (NUNC) verwendet oder verdünnt auf kleine Deckgläschen (ROTH) für mikroskopische Untersuchungen verteilt.

### **2.3.13. Transfektion von GFP-Fusions-Plasmiden in humane Zellen**

Zur Transfektion wurden Zellkulturen verwendet, die etwa 50-60% Konfluenz erreicht hatten. Die Zellen wuchsen dazu auf „Deckgläschen“ (15 mm Durchmesser).

Zur Transfektion der Fusionsplasmide wurde das „*TransFast Transfection Reagent*“ (Promega, USA) nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers verwendet.

Die HEp-2 Zellen wurden zweimal mit DMEM ohne FCS gewaschen und das Medium wurde abgesaugt. 1 µg der EGFP-Fusions-Plasmid-DNA wurde in 900 µl DMEM-Medium ohne FCS verdünnt, mit 12 µl des Transfektions-Reagenz gemischt und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank bei 37 °C gibt man 1 ml Vollmedium (DMEM/10% FCS) zu den Zellen. Nach 24 Stunden konnte dann die Expression der EGFP-Fusions-Proteine mikroskopisch überprüft werden.

### 2.3.14. Stabile Zelllinien

Humane Zellen, die nur transient mit einem Fusions-Plasmid transfiziert wurden, neigen dazu, dass sie das Fusions-Protein häufig überexprimieren.

Gründe dafür sind einerseits der sehr starke virale CMV-Promotor, unter dessen Kontrolle die Gene in dem Plasmid stehen, andererseits kann man nicht kontrollieren, wie viele Plasmide von einer Zelle aufgenommen werden.

Diese Probleme kann man lösen, indem man stabile Zelllinien der EGFP-Fusions-Protein exprimierenden Zellen herstellt. Dazu wurden die Zellen nach einem abgewandelten Protokoll nach Sugimoto et al. [Sugimoto *et al.* (2000)] nach transienter Transfektion mit 20 mM des Antibiotikum G-418 (Geneticin) (CalBioChem, Darmstadt) versetzt. Die Resistenz gegen dieses Antibiotikum ist als Gen auf dem pEGFP-C1-Plasmid kodiert. Daher konnten nur die Zellen weiter wachsen und sich durch Teilung vermehren, die EGFP-Plasmide aufgenommen hatten.

Nach mehreren Wochen dieser Behandlung nehmen die Zellen dann die Gene für die Resistenz und das Fusions-Protein in ihr Genom auf. Diese Zellen exprimierten die Fusions-Plasmide dann in wesentlich niedrigeren, physiologisch verträglichen Mengen, ohne jede Überexpression.

Diese Zelllinien standen dann für *in vivo* und *in situ* Untersuchungen zur Verfügung.

### 2.3.15. Antikörper und Immunfluoreszenz

Die folgenden Antikörper wurden für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse verwendet:

- Humanes **CREST**-Antiserum (ACA) [Fritzler *et al.* (1980)], das Antikörper gegen die Centromerproteine CENP-A, CENP-B und CENP-C und CENP-D enthält (ACA 508525, Universitäts-Klinikum Jena).
- Monoklonaler Maus IgG-Antikörper  $\alpha$ -**GFP** (sc-9996, Santa Cruz Biotechnology, USA).
- Monoklonaler Maus IgG Antikörper  $\alpha$ -**Lamin-A/C** (636), (sc-7292, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Monoklonaler Maus IgM-Antikörper  $\alpha$ -**CLIP-170** (2D6 and 4D3) [Perez, 1999 #17682] (F. Perez (Paris, Frankreich)).

- Monoklonaler Maus IgM-Antikörper  $\alpha$ - $\beta$ -**Tubulin** (C-4585, Sigma-Aldrich) (gekoppelt mit dem Farbstoff Cy3 (Molecular Probes, USA))

Die Deckgläschen mit den darauf adhärent gewachsenen HEp-2 Zellen wurden aus den Kulturschalen entnommen, mehrfach mit PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen und 15 min in 3,7% p-Formaldehyd-Lösung (Sigma-Aldrich) inkubiert. p-Formaldehyd sorgt für eine Quervernetzung der zellulären Komponenten und erlaubt nachfolgende *in situ*-Untersuchungen. Nun erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen in 0,5 % TritonX-100 (5 min, Raumtemperatur), die dann die Antikörper bereitwilliger aufnehmen. Die indirekte Immunfluoreszenz IIF erfolgte nach einem Protokoll nach Spector et al. [Spector *et al.* (1997)]. Hierbei wurden die oben angegebenen primären Antikörper verwendet. Diese ersten Antikörper wurden durch Spezies-spezifische sekundäre Antikörper (Jackson ImmunoResearch, USA) detektiert an denen die Fluorophore Tetramethyl-Rhodamin oder Cy-5 gekoppelt waren. Die chromosomale DNA der Zellen wurde durch die Farbstoffe DAPI (Verdünnung 1:10000 in PBS) und TO-PRO-3 (Verdünnung 1:500 in PBS) angefärbt (beide Molecular Probes, USA). Die Farbstoffe binden in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix an AT-reiche Sequenzen.

Die Zellen auf den Deckgläschen wurden dann mit „MobiGLOW Mounting Medium“ (MoBiTec, Göttingen) auf Objektträger aufgebracht und dort mit farblosem Nagellack (Jade) fixiert und bis zur mikroskopischen Untersuchung bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

### 2.3.16. Western Blotting

Um die Expression von EGFP-Fusionsproteinen in den HEp-2 Zellen zu überprüfen, wurde die „Western-Blot-Technik“ (Elektro-Transfer-Blot) angewandt (abgewandelt nach Sambrook et al. [Sambrook (1989)] und Lottspeich et al. [Lottspeich *et al.* (1998)])

Die Zellen werden dabei zunächst in Kulturflaschen mit dem Fusions-Plasmid transfiziert (siehe oben). Danach wurden sie mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich) von der Oberfläche abgelöst und bei 2000 U/min abzentrifugiert.

Die entstehenden Zellpellets wurden mehrfach mit PBS gewaschen, dann in gewogene „Eppendorf-Tubes“ umgefüllt, abzentrifugiert, und wiederum gewogen. Pro 0,1 g wurden dann 100  $\mu$ l SDS-PAGE-Ladepuffer (2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 35 mM Dithiothreitol, 25 % Glycerin and 60 mM Tris-HCl, pH 6,8) zugegeben und gut vermengt. Nach dem Erhitzen des Gemisches in einem Heizblock bei 100 °C für 10 min waren die Zellen lysiert. Die in der Zellmenge normierten Proben wurden nun für die Auftrennung der Zell-Lysate durch SDS-PAGE (siehe 2.3.13.) verwendet.

Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurde das Gel auf eine etwa gleich große „Protran BA-Nitrocellulose-Membran“ (Schleicher und Schuell, Dassel) gelegt. Darüber und darunter dem Membran/Gel wurden je drei Stück dickes Filterpapier (3MM-Papier, Whatman, USA), platziert. Die Membran und die Filterpapier-Stücke wurden zuvor kurz in Western-Transfer-Puffer (25 mM Tris, 180 mM Glycin, 20% v/v Methanol) getränkt. Das Blotten wurde dann im „Semi-Dry“-Verfahren mit einem „Fast-Blot“ Gerät (Biometra, Göttingen) nach Anweisungen des Herstellers ausgeführt. Die Stromstärke betrug immer 1 mA/cm<sup>2</sup> Gel, die Blot-Zeit 45 min.

Um nach dem Blotten den Protein-Marker sichtbar zu machen und zu markieren, wurde die Blot-Membran durch Schwenken in einer Farbstoff-Lösung mit „Ponceau“-S (Serva) reversibel angefärbt. Danach wurde das „Ponceau“-S mit destilliertem Wasser abgespült. Die Identifizierung der Proteinbanden auf dem Blot erfolgte nach einem Immunoblot-Protokoll über die sequenzielle Bindung zweier spezifischer Antikörper. Ein primärer, das Zielprotein erkennender, Antikörper wird zuerst aufgetragen, ein sekundärer Antikörper (spezies-spezifisch:  $\alpha$ -human,  $\alpha$ -Maus-IgG), der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert war und der den primären erkennt, folgte.

Die Membran wurde dabei vor dem eigentlichen Antikörper-Nachweis für eine Stunde in PBS-T (PBS mit 1% Tween-20 (Serva), dem 5% Magermilch-Pulver (ROTH) zugesetzt war, geschwenkt, um unspezifische Epitope zu blockieren. Nach 2-maligem Waschen der Membran in PBS-T für je 10 min unter Schwenken folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für eine Stunde. Nach weiteren 2 Waschschritten (PBS-T, 10 min) wurde die Membran für erneut eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:4000 in PBS-T) inkubiert und nachfolgend nochmals dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen.

Die Detektion der Banden erfolgte mit dem „ECL Western Blot Detection Kit“ (Amersham-Biosciences, USA), das ein Substrat für die Meerrettich-Peroxidase der sekundären Antikörper enthält, genau nach den Anweisungen des Herstellers. In einer Chemilumineszens-Reaktion wird nun an den Stellen der erkannten Protein-Banden Licht der Wellenlänge von 440 nm freigesetzt, dessen Menge direkt proportional zur detektierten Proteinmenge ist. Röntgenfilme (Biomax ML, KODAK, USA) wurden jetzt in einer Stahlkassette zwischen 1 min und 24 h diesem Licht ausgesetzt und danach entwickelt, was die Banden sichtbar machte.

### 2.3.17. Konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie

Als mikroskopische Methode kam die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zum Einsatz. Als Mikroskop stand hierfür ein Zeiss LSM-510-META (Grundmikroskop Zeiss Axiovert 200M) (Carl Zeiss, Jena) zur Verfügung. Konfokal-Mikroskope erlauben es durch ihren optischen Aufbau, Bilder aus definierten sehr dünnen Schichten (ca. 100 nm) des zu untersuchenden Objektes aufzunehmen. Man ist daher in der Lage, quasi optische Schnitte durch das Objekt zu legen, ohne dass Informationen aus darüber oder darunter liegenden Schichten in das Bild eingehen. Daher kann man davon ausgehen, dass an der optisch gleichen Position detektierte („kolokalisierende“) Signale auch wirklich am gleichen Ort entstanden sind.

Als Objektiv kam zumeist das 63x/1.40 Plan-Apochromat-Öl-DIC-Objektiv zum Einsatz. Die Farbstoffe wurden durch die Einstrahlung von Laserlicht der Wellenlängen 488 nm (EGFP und Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)) (Argon-Laser, LASOS, Göttingen), 543 nm (Tetramethyl-Rhodamin, Cy-3) (Helium-Neon-Laser, LASOS, Göttingen) und 633 nm (Cy-5 und TO-PRO-3) (He-Ne-Laser, LASOS, Göttingen) angeregt und nachfolgend detektiert. Der DNA-Farbstoff DAPI wurde mit UV-Licht der Quecksilberdampf-Lampe HBO-100 des Zeiss-Mikroskops aufgenommen.

Um zu verhindern, dass es zum Durchbluten von einzelnen Farben kam (Signale von einem Farbstoff werden im Kanal eines Anderen mit angeregt und auch aufgenommen), wurden die einzelnen Farbstoffe nicht zusammen angeregt und detektiert, sondern es kam der „Multi-Track-Modus“ des Zeiss LSM-510 zum Einsatz, bei dem die Laser-Anregung der Farbstoffe nacheinander erfolgt. Das Gesamtbild wird danach elektronisch erstellt. Zum Anderen wurden bei der Detektion der Signale möglichst enge „Bandpass-Filter“ eingesetzt, die nur die „Peak-Regionen“ des jeweiligen Fluoreszenz-Signals beinhalten. GFP wurde mit einem Bandpass von 505-530 nm, Rhodamin (Cy-3) mit 560-615 nm und TO-PRO-3 dann mit einem Langpass, der für Licht der Wellenlängen von 650 nm aufwärts durchlässig ist, detektiert.

Einzelne optische Schnitte wurden dadurch ausgewählt, dass das Objekt (der Zellkern der HEp-2-Zelle) in z-Richtung durchfokussiert wurde, oder sie entstanden automatisch, wenn das Mikroskop eine ganze Schnittserie („z-Stack“) durch den Nukleus aufnahm. Die Bilder wurden dann einzeln mit dem Zeiss-LSM-Software-Paket Version 3.2 im TIF-Format (Tag Image File) gespeichert und nachfolgend mit Adobe Photoshop 6.0 zusammengesetzt.



### 2.3.18. RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist der Prozess, bei dem kurze 19-21 lange Oligonukleotide doppelsträngiger RNA den sequenz-spezifischen Abbau eines zur dsRNA komplementären mRNA bewirken. Bei dieser Technik wird entweder über direkte Transfektion oder aber durch die Expression von kurzen 21-23 Nukleotiden doppelsträngiger RNA in Zellen hochspezifisch die Neubildung von Proteinen, aus deren c-DNA das zu der RNA-Sequenz komplementäre DNA-Stück stammt, unterbunden. Dies ist eine extrem effiziente, für die Zellen selbst aber schonende Methode des „Gen-Knockouts“ in lebenden Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein modifiziertes Verfahren nach Elbashir, Tuschl et al [Elbashir *et al.* (2001a)] angewendet. Grundsätzlich sollen bei der Konstruktion von siRNA-Sequenzen folgende Regeln beachtet werden:

- Länge der Einzelstränge: 21-23 Nukleotide.
- Die Ziel-Region auf der cDNA soll in etwa bei 50 bis 100 Nukleotiden gerechnet vom Start-Codon beginnen.
- Die Sequenz soll mit einem Adenin-Dimer (AA) beginnen.
- Der G/C-Gehalt soll zwischen 50 und 70 Prozent betragen.
- Die Zielregion muss im Genom einmalig sein. Daher muss die Zielregion mit einer „BLAST“-Suche (Im Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) überprüft werden, ob sie wirklich nur in einem Gen vorkommt.

Die siRNAs wurden nach diesen Grundregeln konstruiert und bei der IBA GmbH, Göttingen, hergestellt:

<b>CENP-A-1:</b>	<u>Ziel-Region (cDNA):</u>	5'-AAGCCCGAGGCCCGAGGAGGCG-3'
	Sense-RNA	5'-GCCCGAGGCCCGAGGAGGUU-3'
	Antisense-RNA:	5'-CCUCCUCGGGGCCUCGGGCUU-3'
<b>CENP-A-2:</b>	<u>Ziel-Region (cDNA):</u>	5'-AACACAGTCGGCGGAGACAAGGT-3'
	Sense-RNA	5'-CACAGUCGGCGGAGACAAGUU-3'
	Antisense-RNA:	5'-CUUGUCUCCGCCGACUGUGUU-3'
<b>Lamin A/C:</b>	<u>Ziel-Region (cDNA):</u>	5'- AACTGGACTTCCAGAAGAACATC-3'
	Sense-RNA:	5'-CUGGACUUCAGAGAAGACAdTdT-3'
	Antisense-RNA:	5'-UGUUCUUCUGGAAGUCCAGdTdT-3'

Diese Oligos lagen sowohl als doppelsträngige RNA, als auch in den Einzelsträngen vor.

Hep-2-Zellen wurden in Kultur-Petrischalen (NUNC) sehr dünn ausgesät und wuchsen dort bis zu einer Konfluenz von 20%. In den Schalen lagen noch 4 sterile Deckgläschen, um zu mehreren Zeitpunkten Zellen für mikroskopische Analysen der RNAi-Phänotypen entnehmen zu können. Daraufhin wurden die Zellen mit 3 µg der siRNA-Doppelstränge transfiziert, wobei als Transfektions-Mediator "OligofectAmine Reagent" (Invitrogen, USA) nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers verwendet wurde. Nach jeweils 24 Stunden wurde den Kulturschalen eines der Deckgläschen entnommen, um die Hep-2 Zellen zu überprüfen. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, in dem sie unter sterilen Bedingungen mit einem Zellschaber (NUNC) von der Oberfläche abgelöst wurden.

Ein Teil der Zellen wurde dann für Western-Blot-Analysen lysiert (siehe oben), um zu detektieren, in welchem Umfang RNAi die Konzentration des Ziel-Proteins reduziert hatte. Diese Blots konnten mit dem Programm MacCam (Cybertech, Berlin) densitometrisch ausgewertet werden, nach dem sie eingescannt wurden. Bei den restlichen Zellen wurde die Morphologie der Zellkerne untersucht und ob es sich um lebende Zellen handelte.

### 2.3.19. Zell-Assays

Die Anzahl der gesunden Zellen wurde mit einem Ansatz überprüft, bei dem die DNA der HEp-2 Zellen nur mit DAPI gefärbt wurde. Das äußere Erscheinungsbild der Nuklei konnte verwendet werden, um gesunde Zellen von apoptotischen oder toten Zellen zu unterscheiden. Zellen mit einem optisch gleichmäßigem äußerlich „glatt“ erscheinenden Nukleus, in denen die Nukleoli klar zu erkennen ist, können leicht von Zellkernen unterschieden werden, die ausgefranst aussehen, sehr ungleichmäßig geformt sind und keine sichtbaren Nukleoli mehr haben.

Außerdem kann bei normiertem Verfahren die Gesamtzahl der Zellen auf einen Deckgläschen untersucht werden.

In einem parallel durchgeführten Verfahren wurde bei den Zellen, die nach 72 Stunden RNAi geerntet wurden, die exakte Zahl der lebenden Zellen auf den Deckgläschen bestimmt. Dabei wurde das Kulturmedium der Petri-Schalen mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und bei 2000 U/min abzentrifugiert. Damit konnten auch sterbende oder schon tote Zellen, die nicht mehr adhärent wuchsen, in das Endergebnis mit einbezogen werden. Die restlichen Zellen wurden, wie oben beschrieben, abgeschabt und dann in 1

ml PBS (Sigma-Aldrich) resuspendiert und mit den abzentrifugierten Zellen aus dem Kultur-Überstand vereinigt. 50  $\mu$ l dieser Suspension wurden mit 50  $\mu$ l Trypanblau (Sigma-Aldrich) vermischt und das Gemisch wurde dann auf eine Zählkammer nach Neubauer (verbessert, Roth) aufgetragen. Trypanblau vermag in sterbende und tote Zellen einzudringen, diese sind dann im Mikroskop an ihrer blau-schwarzen Farbe zu erkennen, lebendige Zellen bleiben farblos (weiß).

### 2.3.20. Das „Abschütteln mitotischer Zellen“

Wenn Säugerzellen adhärent auf Oberflächen wachsen, zeigen sie am Beginn der Mitose einen besonderen Phänotyp, sie sind nicht mehr flach, sondern sie kugeln sich ab. Infolgedessen sind sie nicht mehr so fest an der Oberfläche verankert.

Um für mikroskopische Untersuchungen mehr Zellen in der Mitose zu erhalten, oder um Zellen sehr schonend, ohne den Einsatz spezieller, den Zellzyklus beeinflussender, Reagenzien, zu synchronisieren, waren mit den so genannten „mitotic Shake-Offs“, wie sie auch in Spector et al. [Spector *et al.* (1997)] beschrieben werden, die besten Ergebnisse zu erzielen. Diese Methode wurde vor allem auch bei den stabilen Zelllinien durchgeführt. Die Zellen wurden in Kulturflaschen angezogen und bei etwa 80 Prozent Konfluenz wurde das „Abschütteln der mitotischen Zellen“ vollzogen. Das Medium wurde abgezogen und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Dann wurde frisches Medium zugegeben und dann die mitotischen Zellen durch Klopfen an die Kulturflasche von der Oberfläche abgelöst. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgesaugt und abzentrifugiert. Zur Zellsynchronisation wurden die Zellen dann als Inokulum in frisches Medium gegeben. Für mikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen resuspendiert, auf, mit Poly-L-Lysin überzogene, Deckgläschen (Protokoll [Spector *et al.* (1997)]) getropft, und dort sofort mit 7,4 % p-Formaldehyd fixiert. Eine indirekte Immunfluoreszenz wurde dann durchgeführt, wie oben beschrieben.

### **3. Ergebnisse**

Die Centromer-/Kinetochor-Struktur bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und beim Menschen sind sehr unterschiedlich, sowohl auf DNA- als auch auf Protein-Ebene. In beiden Organismen haben die Komplexe jedoch die gleiche Funktion. Auf Proteinebene finden sich sequenzhomologe Komponenten aber auch Komponenten, die jeweils nur in einer der beiden Spezies vorkommen. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Kinetochor-Proteine der Hefe in menschlichen Zellen an den Centromer-Bereich rekrutiert werden und dort möglicherweise funktionell sind.

#### **3.1. Klonierung von Kinetochor-Proteinen in humane Expressionsvektoren**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf cDNA-Ebene Kinetochor-Proteine der Hefe als Fusionen mit dem Grün Fluoreszierenden Protein GFP hergestellt (siehe Tab. 1).

Die Expressionsvektoren wurden dann dazu benutzt, die jeweiligen Fusionsproteine nach transienter oder stabiler Transfektion in menschlichen Zellen zu exprimieren und zu analysieren.

##### **3.1.1. Stabile Zelllinien**

Transient transfizierte Zellen exprimieren das Fusionsprotein nur über wenige Zellzyklen [Spector *et al.* (1997)]. Vier Proteine (Cse4, Mif2, Bik1 und Okp1) zeigten eine besonders starke Expression in transient transfizierten Zellen. Deswegen wurden von diesen 4 Proteinen der Bäckerhefe sowie dem humanen CENP-A jeweils stabile Zelllinien hergestellt (siehe 2.3.11).

#### **3.2. Lokalisation von Kinetochor-Proteinen der Hefe *S. cerevisiae* in menschlichen Zellen**

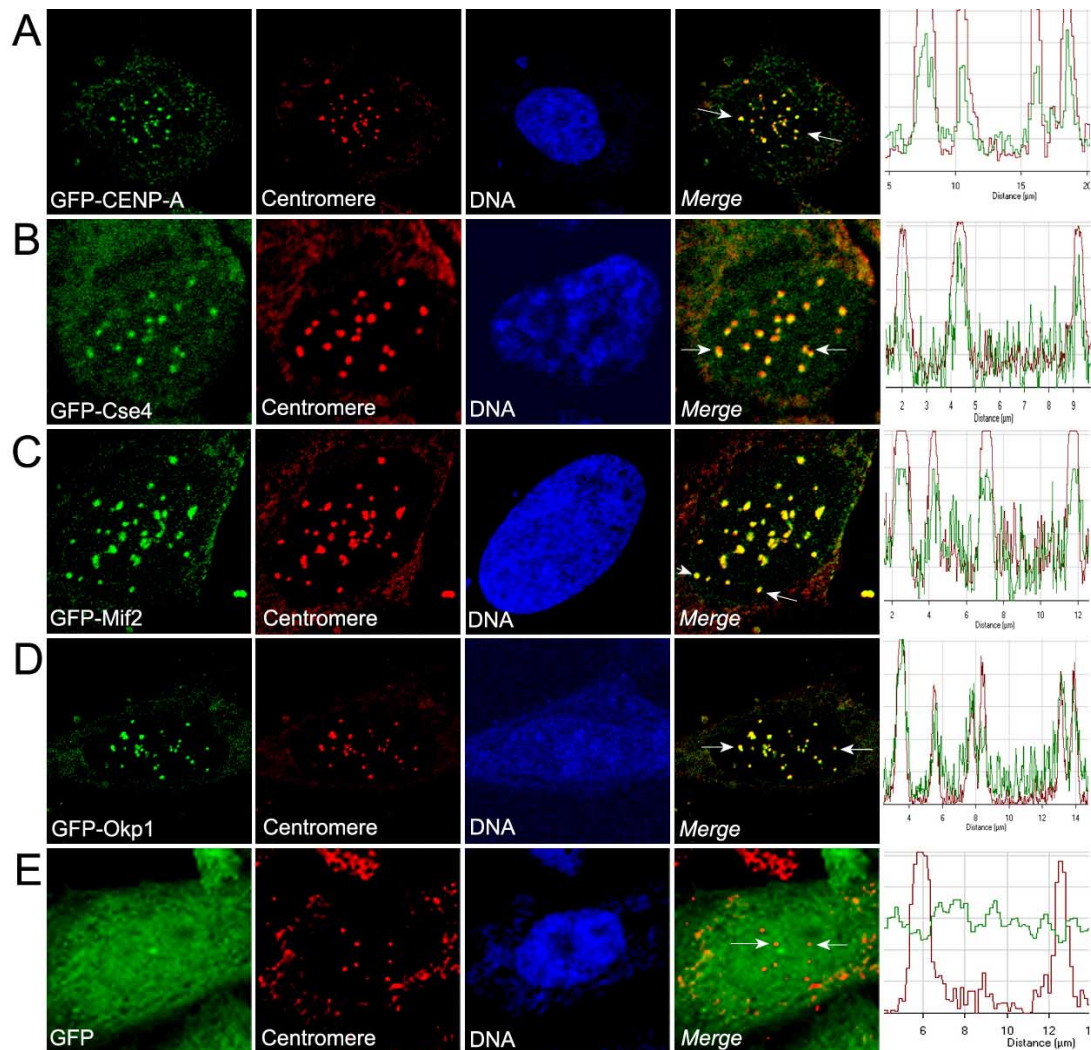
Ausgangspunkt der vorgestellten Arbeiten war die Beobachtung, dass homologe Proteine von CENP-A aus anderen Spezies an Centromere und an das sie umgebende

pericentromerische Heterochromatin von menschlichen HeLa-Zellen rekrutiert werden [Henikoff *et al.* (2000)].

Der grundsätzlichen Idee folgend, dass auch Centromer-Protein-Homologe aus anderen Spezies nach ektopischer Expression ebenfalls an humane Centromere rekrutiert werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit stabile Zelllinien, die EGFP-Cse4, EGFP-Mif2 und EGFP-Okp1 exprimieren, konfokal-mikroskopisch untersucht. Die zu diesen Proteinen jeweiligen homologen Kinetochorproteine des Menschen sind CENP-A, CENP-C und CENP-F.

Zellen der stabilen Zelllinien wurden fixiert und konfokal-mikroskopisch analysiert. Centromere wurden in den selben Zellen mit Hilfe eines Autoimmunserums (ACA), das spezifisch CENP-A, -B und -C erkennt, sichtbar gemacht. Als Positiv-Kontrolle wurde bei diesen Untersuchungen die stabile Zelllinie von CENP-A mit einbezogen. Als Negativ-Kontrolle wurde ein GFP-Vektor ohne Fusion in HEp-2-Zellen transfiziert.

Abb. 7a zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Gezeigt ist jeweils eine konfokale Ebene eines Zellkerns. GFP-CENP-A, GFP-Cse4, GFP-Mif2 und GFP-Okp1 lokalisieren in Interphase-Zellkernen an denselben Stellen (grün), die durch Antikörperfärbung von endogenen Centromerproteinen angefärbt werden (rot). Die Übereinanderlagerung der beiden Signale ergibt die Mischfarbe gelb („Merge“). Die DNA wurde zusätzlich gefärbt, um den Zellkern sichtbar zu machen (blau). Die Kolo-kalisation wurde zusätzlich durch einen „line-scan“ entlang der durch Pfeile markierten Linien in der Übereinanderlagerung („Merge“) analysiert (Abb 7a, A-D, rechte Graphik). Ein „line-scan“ zeigt die Intensität von Pixelintensitäten verschiedenfarbiger (z.B. grün und rot) Kanäle entlang einer Linie in einer Grafik an. Die Überlagerung von Intensitätsmaxima ist dabei ein Kriterium für die Kolo-kalisation von zwei verschiedenfarbigen Signalen. Die „line-scans“ für GFP-CENP-A-, GFP-Cse4-, GFP-Mif2- und GFP-Okp1-Signale zeigen eine starke Überlappung mit den Signalen der Centromerfärbung. Dies bestätigt die Kolo-kalisations-Analyse des Überlagerungs-Bildes. Im Gegensatz zu GFP-CENP-A, GFP-Cse-4, GFP-Mif2 und GFP-Okp1 lokalisiert das unfusionierte GFP gleichmäßig in der gesamten Zelle (Fig. 7a, E). Diese Ergebnisse zeigen, daß das humane Protein CENP-A, wie erwartet war, aber auch die Centromerproteine Cse-4, Mif2 und Okp1 aus *S. cerevisiae* nach ektopischer Expression in menschlichen Zellen an Centromere rekrutiert werden und dort möglicherweise in den Kinetochorkomplex eingebaut werden. Dieser Effekt wird nicht durch GFP verursacht, da GFP alleine keine präferenzielle Lokalisation an Centromeren zeigt (Abbildung 7a, E).

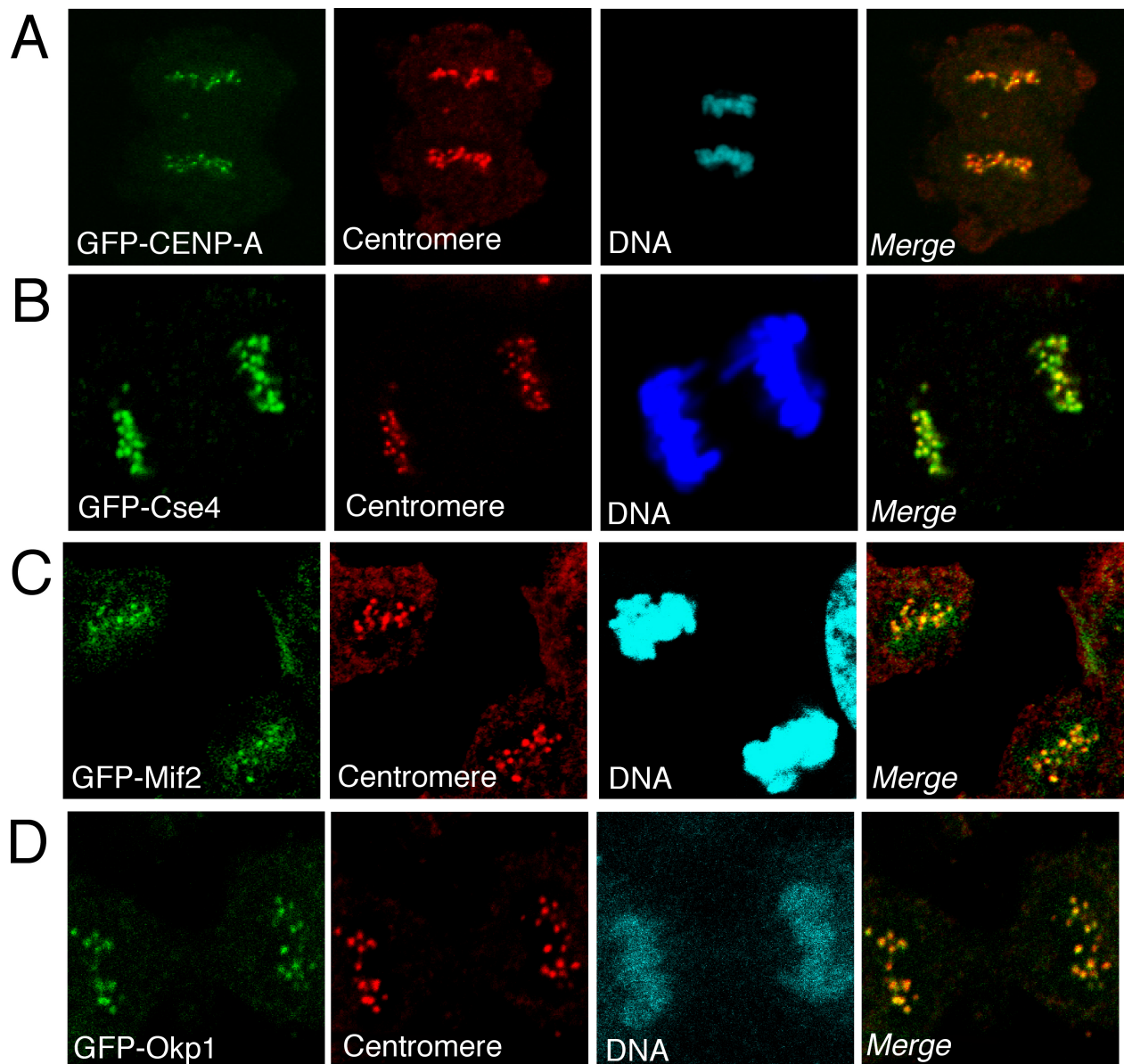


**Abb 7a: Kinetochorproteine der Hefe *S. cerevisiae* lokalisieren am Centromer von menschlichen Interphase-Zellen.**

Plasmide, welche die cDNA für die Fusionsproteine GFP-CENP-A (A), GFP-Cse4 (B), GFP-Mif2 (C), GFP-Okp1 (D) bzw. GFP alleine (E) enthalten, wurden in menschliche Hep-2-Zellen stabil (A-D) bzw. transient (E) transfiziert. Transfizierte Zellen auf Deckgläschen wurden fixiert und die Centromere durch Immunfluoreszenz bzw. der Zellkern durch DNA-Färbung (blau), markiert. Die Abbildungen zeigen jeweils eine konfokale Ebene (ca. 0,5 μm Schichtdicke) eines Zellkerns. Die Signale des GFP-Fusionsproteins entstehen dabei durch die Autofluoreszenz des GFPs (Anregung bei 488 nm), die der Centromere durch einen Rhodamin-gekoppelten sekundären anti-human-Antikörper (543 nm), und die DNA-Färbung durch die Fluoreszenz des To-PRO-3-Farbstoffs (633 nm). Die roten und grünen Signale wurden übereinandergelagert („Merge“) und ein „line scan“ (s. Text) auf einer Linie zwischen den angezeigten Pfeilen des Merge-Bildes durchgeführt. Die Auswertung der line-scans ist jeweils graphisch auf der rechten Seite dargestellt.

Die Verteilung der Hefe-Kinetochor-Proteine wurde auch in Zellen untersucht, die sich in der Mitose befinden (Abb. 7b). GFP-CENP-A, GFP-Cse4, GFP-Mif2 und GFP-Okp1 lokalisieren in mitotischen Zellen an den gleichen Stellen (grün), die durch eine Antikörperfärbung von endogenen Centromerproteinen markiert werden (rot). Wenn die Signale beider Kanäle überlagert werden, ergibt sich als Mischfarbe gelb („Merge“). Auch

die Signale in den Mitose-Zellen wurden mit „*line-scans*“ überprüft, was die Kolokalisations-Studien bestätigt (nicht gezeigt).

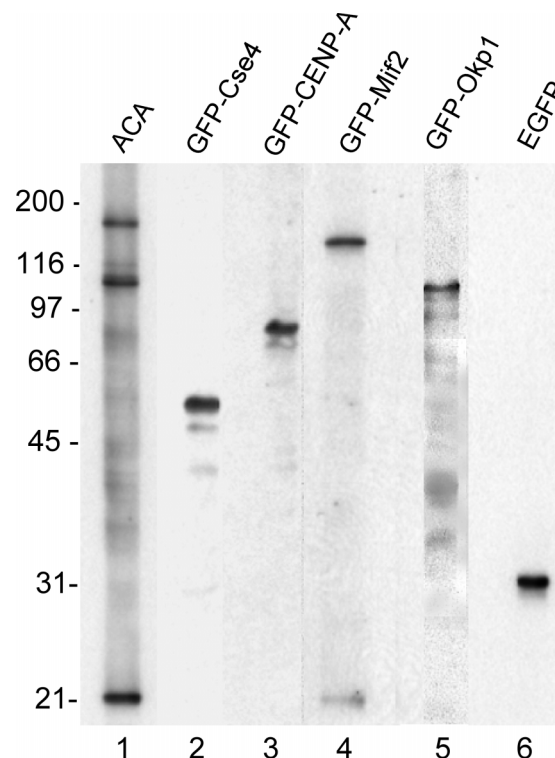


**Abb 7b: Kinetochorproteine der Hefe *S.c.* lokalisieren am Kinetochor humaner Mitose-Zellen.** Plasmide, die die cDNA für die Fusionsproteine GFP-CENP-A (A), GFP-Cse4 (B), GFP-Mif2 (C), GFP-Okp1 (D) enthalten, wurden stabil in menschliche HEP-2-Zellen (A-D) transfiziert. Transfizierte Zellen auf Deckgläschen wurden fixiert und ihre Centromere durch Immun-Fluoreszenz bzw. die Chromosomen durch DNA-Färbung (blau), markiert. Die Abbildungen zeigen jeweils eine konfokale Ebene (ca. 0,5  $\mu$ m Schichtdicke) einer mitotischen Zelle. Die roten und grünen Signale wurden übereinandergelagert („Merge“).

In einer Protein-Blot-Analyse wurde getestet, ob die EGFP-Fusions-Proteine in menschlichen Zellen in ganzer Länge exprimiert wurden. Zellen der stabilen Zelllinien, welche die Fusions-Proteine exprimierten, wurden lysiert und ihre Zell-Extrakte in einem



PAA-Gel aufgetrennt. Auf der Blotmembran wurden die EGFP-Fusions-Proteine dann mit einem GFP-Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurde ein ACA-Serum verwandt, welches die endogenen Centromer-Proteine CENP-A, -B und -C erkennt. In Abbildung 7c ist das Ergebnis dieser Analyse zu sehen. Unfusioniertes GFP (Mr: 27 kD) konnte in der korrekten Größe detektiert werden (Abb 7c, Bahn 6). Auch das Fusionsprotein EGFP-Cse4 (Mr von Cse4: 27 kD) zeigte die erwartete Größe (Bahn 2). Mif2 (Mr: 62 kD), Okp1 (Mr: 47 kD) und CENP-A (Mr: 16 kD) zeigten leider aberrantes Laufverhalten im Gel, entsprachen aber den Volle-Länge-Proteinen.



**Abb. 7c: EGFP-Cse4, -Mif2 –Okp1 und –CENP-A werden als Volle-Länge-Protein exprimiert.**

#### Western-Blot

Plasmide, die die cDNA für die Fusionsproteine GFP-CENP-A (3), GFP-Cse4 (2), GFP-Mif2 (4), GFP-Okp1 (D) und GFP (6) enthalten, wurden stabil (2-5) und transient (6) in menschliche HEP-2-Zellen transfiziert. Transfizierte Zellen wurden lysiert, und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Für die Lysate der Bahn 1 wurden untransfizierte Zellen verwendet. Die endogenen Centromer-Proteine CENP-A, -B und -C werden dort durch ein ACA-Serum erkannt. In den Bahnen 2-6 werden die GFP-Fusionsproteine jeweils mit einem mit einem  $\alpha$ -GFP-Antikörper detektiert. Diese Antikörper werden durch HRP-gekoppelte  $\alpha$ -human (1) und  $\alpha$ -Maus-IgG (2-6) erkannt und mit einem Chemilumineszenz-Verfahren sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde der Broad-Range-Protein-Marker (BioRad, USA) verwendet. Die Größen der darin enthaltenen Proteine sind links aufgetragen.

Zusammenfassend konnte hiermit geschlossen werden: Drei Kinetochor-Proteine der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* werden in humanen Zellen exprimiert und lokalisieren dort unabhängig von der Phase des Zellzyklus am Centromer menschlicher Zellen.



### 3.3. Cse4 ersetzt die Funktion von CENP-A

Das Kinetochor-Protein Cse4 der Bäckerhefe ersetzt in den Nukleosomen der Centromer-Region das Histon-H3, zu dem es eine 64-prozentige Homologie aufweist. CENP-A ist das dazu homologe, humane Gegenstück. Es ersetzt Histon-H3 in den Centromer-Nukleosomen menschlicher Zellen.

Da im vorangegangenen Experiment gezeigt wurde, dass Cse4 an den Kinetochoren von humanen Zellen lokalisiert, wurde nun getestet, ob das Hefe-Protein Cse4 das humane CENP-A funktionell ersetzen kann. Dazu wurde zunächst die endogene CENP-A-Protein-Funktion durch die RNAi-Technik ausgeschaltet. In der Folge wurde dann untersucht, ob ektopisch eingebrachtes Cse4 den Phänotyp der CENP-A-depletierten Zellen komplementieren kann.

Um ein unabhängiges Protein zur Kontrolle der RNAi-Experimente zu untersuchen, wurde zusätzlich RNAi für die Zielregion auf der cDNA der in Elbashir et al. [Elbashir *et al.* (2001a)] beschriebenen Proteine der Kernhülle, Lamin A/C (Beide Proteine sind Spleiß-Varianten ein und derselben cDNA) durchgeführt.

Wie in 2.3.18. beschrieben, wurde in den folgenden Experimenten CENP-A und Lamin A/C mittels RNAi depletiert. Spezifische siRNAs wurden in die HEP-2-Zellen transfiziert, um die Neusynthese von CENP-A bzw. Lamin A/C zu unterbinden. Vorhandenes CENP-A wird mit dieser Technik nicht aus den Zellen entfernt. 72 Stunden nach der Transfektion mit den siRNAs wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Zellextrakte im Western-Blot analysiert. CENP-A wurde mit ACA-Seren erkannt, Lamin A/C mit einem monoklonalen Antikörper detektiert. Die Blots wurden nachfolgend eingescannt und die Banden densitometrisch ausgewertet.

Abbildung 8 B zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. In Zellen die mit den beiden RNAi-Duplicates gegen CENP-A behandelt wurden, konnten nur noch 4 % (CENP-A-1) und 7% (CENP-A-2) (jeweils im Vergleich zu der Menge in den Zellen der Mock-Kontrolle) nachgewiesen werden. Während die CENP-A-Menge durch die spezifische siRNAs in den Zellen herunterreguliert wurde, blieb die Menge eines Kontrollproteins (Sm) in allen Lysaten gleich (Abb 8 B).

Als weitere Kontrolle wurden, wie oben erwähnt, die Kernhüllen-Proteine Lamin A und C mittels RNA-Interferenz herunterreguliert. Während die Menge von Lamin A und C bei der Behandlung der Zellen mit siRNAs gegen CENP-A-1 und CENP-A-2 völlig gleich bleibt, lässt die Behandlung der Zellen mit siRNAs gegen Lamin A/C dieses in den Zellen

fast vollständig verschwinden (Abbildung 8B). Nur die spezifischen RNAi Doppelstränge waren in der Lage, das Zielprotein zu depletieren, weder der Einsatz der Einzel-Stränge, noch Wasser (Mock-Kontrolle, Siehe Abbildung 8A, B) hatte einen messbaren Effekt. In den mit „Mock“-Kontrolle bezeichneten Zellen wurde die gesamte RNAi-Prozedur durchgeführt, nur wurde das siRNA-Oligo durch Wasser ersetzt.

Die RNAi-behandelten Zellen wurden zusätzlich mikroskopisch untersucht. Dazu wurden die in 2.3.19. beschriebenen „DAPI-Zell-Assays“ verwendet. Die nukleäre DNA der Zellen wurde mit DAPI angefärbt. Im Anschluss daran wurden sowohl die Menge der überlebenden Zellen, sowie die Zellkern-Morphologie analysiert.

In Abbildung 8A sind die Resultate dieser Untersuchungen gezeigt. RNAi-behandelte Zellen, nicht aber die Kontroll-Zellen, zeigen einen sehr großen Anteil von apoptotischen, sterbenden Zellen, die klar von den gesunden Zellen unterschieden werden konnten. Gesunde Zellen sind an einer glatten Oberfläche der Kernhülle (Interphase) sowie an deutlichen Nukleoli zu erkennen. Die so detektierten Zellzahlen der Zellen sind in Abbildung 8A relativ zu denen der Mock-Kontroll-Zellen dargestellt. Die RNAi-Versuche CENP-A-1 und CENP-A-2 resultierten jeweils in  $(42 \pm 4) \%$  und  $(48 \pm 4) \%$  Zellen. Das RNAi-Experiment gegen Lamin A/C führte zu noch  $(83 \pm 4) \%$  Zellen. Dies sind jeweils die Mittelwerte von 10 unabhängigen Experimenten (siehe Abbildung 8A).

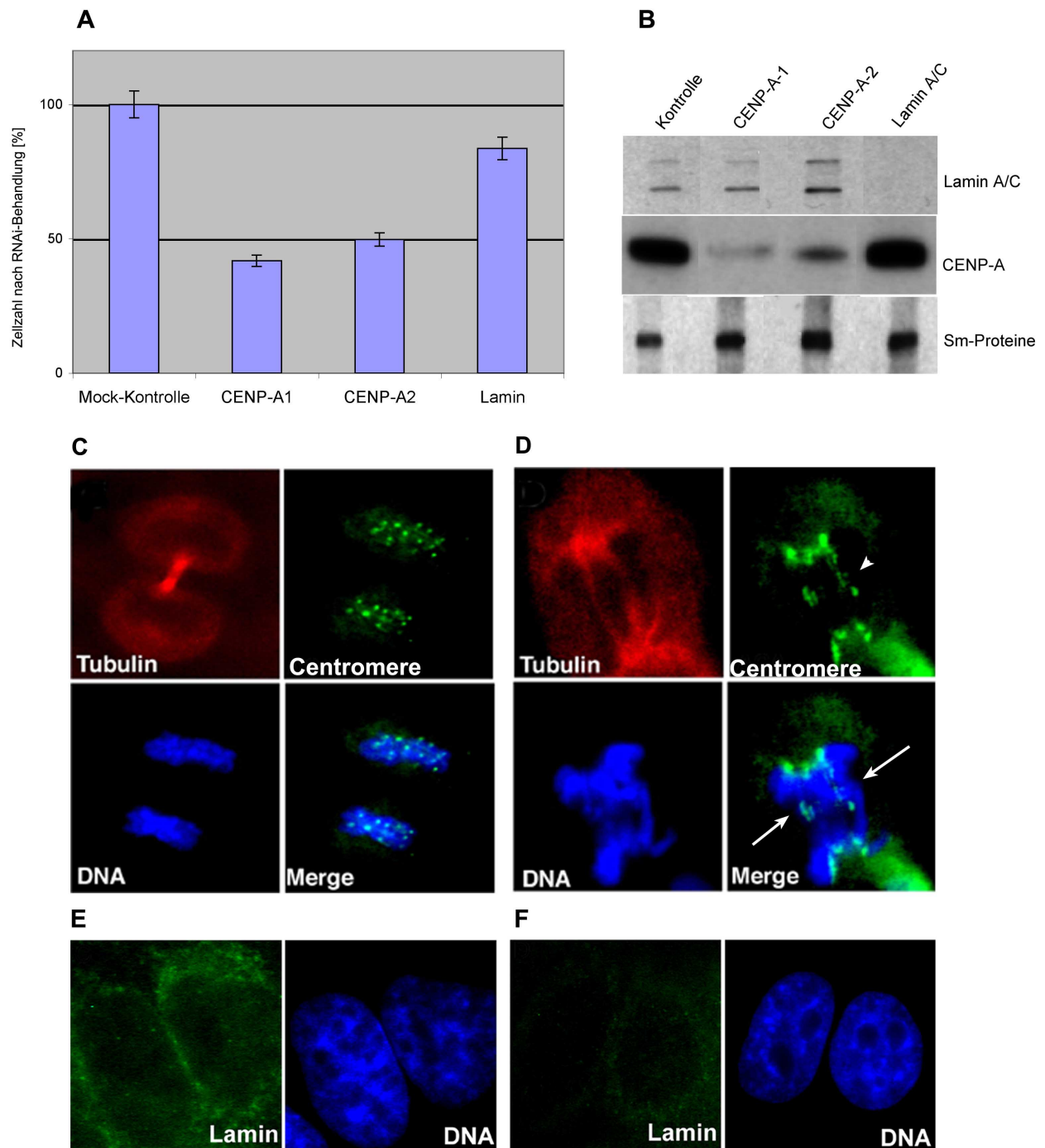
Die absolute Menge der lebenden Zellen wurde auch durch eine alternative Methode bestimmt (siehe 2.3.19.). Hier wurde eine Zell-Zählung nach Neubauer durchgeführt. Da bekannt ist, dass der Farbstoff Trypan-Blau nur in tote und sterbende Zellen eindringen kann, ist es auf einfachem Wege möglich, lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Bei der Anwendung dieser Methode konnten für CENP-A-1  $(48 \pm 2)\%$  sowie für CENP-A-2  $(47 \pm 2) \%$  lebende Zellen relativ zur Mock-Kontrolle gefunden werden (siehe Abbildung 9). Der für Lamin A und C gefundene Wert an lebenden Zellen betrug hier  $(90 \pm 3) \%$  (nicht gezeigt). Die Ergebnisse bestätigten die mit dem DAPI-Zell-Assay erhaltenen Werte.

Das Herunterregulieren von CENP-A schädigt die Zellen anscheinend sehr stark, während Lamin A und C nicht so essenziell für das Überleben der Zellen sind.

In diesem Stadium der Experimente war es daher sehr wichtig, zu erfahren, inwiefern die Zellen durch den Knockout von CENP-A funktionell beeinträchtigt wurden. Dazu wurden Zellen, die auf Deckgläschen gewachsen waren, 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion der siRNAi-Oligos gegen CENP-A und Lamin A und C immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dabei wurden die Zellen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Tubulin und Centromere angefärbt. Während Zellen, bei denen die Menge von CENP-A

---

herunterreguliert wurde, nach 24 und 48 Stunden noch keine erkennbaren Zeichen von Fehlern in der Mitose zeigten (nicht gezeigt), änderte sich der Phänotyp nach 72 Stunden dramatisch. Weit über 70 % der Zellen waren tot und viele der übrig gebliebenen Zellen zeigten einen aberranten Mitose-Phänotyp. Abbildung 8D zeigt eine dieser Zellen mit deutlichen Zeichen von mitotischen Defekten. Man erkennt bei dieser Zelle in der Anaphase, dass Chromatiden nicht vollständig getrennt worden waren („*lagging chromosomes*“) und mitotische Spindelfasern stark verlängert sind (siehe Abbildung 8D, Merge, Pfeile). Auf den Deckgläschen mit Zellen der Mock-Kontrolle zeigten sich keine aberranten Mitosen (siehe Abbildung 8C). Die Ergebnisse zeigten, dass Zellen, bei denen CENP-A durch RNAi ausgeschaltet wurde, mitotische Probleme aufweisen und eine stark erhöhte Letalität besitzen.



**Abb. 8: RNAi inhibiert die Funktion von CENP-A und Lamin A/C.**

CENP-A und Lamin A/C werden mit den siRNA-Oligos transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion erfolgt die Analyse der Phänotypen.

**A: Zellzahlbestimmung nach RNAi-Behandlung** (normiert auf Zellzahl der Mock-Kontrolle);

Zellen auf Deckgläschen, die mit RNAi-Oligos transfiziert waren, wurden fixiert. Ihre DNA wurde mit DAPI sichtbar gemacht. Die Zellen wurden am Mikroskop mit UV-Licht bestrahlt. Von den Zellen wurden jeweils Bilder aufgenommen und die darauf sichtbaren Zellen gezählt.

(Mock-Kontrolle: RNAi-Versuch mit Wasser an Stelle eines siRNA-Oligos; CENP-A-1, CENP-A-2, Lamin A/C zeigen Zellzahl nach Behandlung mit diesen siRNA-Duplices (siehe Text).

**B: Western Blot;**

RNAi-Oligos wurden in humane Zellen transfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Lysate wurden einer Western-Blot-Analyse unterzogen

obere Reihe, Lamin A/C (AK  $\alpha$ -Lamin A/C), mittlere Reihe, CENP-A (ACA-Serum), Untere Reihe, Sm-Proteine (AK  $\alpha$ -Sm (Ponton));

Bahn Kontrolle: Mock-Kontrolle

Bahn CENP-A-1: CENP-A wurde durch siRNAi-Oligo CENP-A-1 depletiert

Bahn CENP-A-2: CENP-A wurde durch siRNAi-Oligo CENP-A-2 depletiert

Bahn Lamin A/C Lamin A/C wurde durch siRNAi-Oligo Lamin A/C depletiert.

**C: Mitotische Zelle der Mock-Kontrolle;** Tubulin wird erkannt durch Immunfluoreszenz mit einem AK  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin (Cy3-konjugiert, links oben, rot), Centromere werden mit ACA-Seren (Sekundär-AK: FITC  $\alpha$ -human) detektiert (rechts oben, grün), DNA-Färbung mit DAPI (links unten, blau) nachgewiesen, das „Merge“-Bild zeigt die Überlagerung der Bilder DAPI und Centromere (rechts unten).

**D: Mitotische Zelle, bei der CENP-A durch RNAi depletiert wurde;** Tubulin wird erkannt durch AK  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin (Cy3-konjugiert, links oben, rot), Centromere werden mit ACA-Seren (Sekundär-AK: FITC  $\alpha$ -human, rechts oben, grün) detektiert, DNA-Färbung mit DAPI (links unten, blau), das Merge-Bild zeigt die Überlagerung der Bilder „DAPI“ und „Centromere“ (rechts unten).

Die weiße Pfeilspitze in dem Bild „Centromere“ zeigt die Centromere von Chromosomen, die in der Mitose nicht korrekt getrennt wurden, die Pfeile im Bild „Merge“ zeigen „lagging chromosomes“, zu denen diese Centromere gehören.

**E: Interphasen-Zellen der Mock-Kontrolle;** AK  $\alpha$ -Lamin A/C, Sekundärer FITC-AK (links, grün), DNA-Färbung mit DAPI (blau, rechts).

**F: Interphasen-Zellen, deren Lamin A/C durch RNAi depletiert wurde;** AK  $\alpha$ -Lamin A/C, Sekundärer FITC-AK (links, grün), DNA-Färbung mit DAPI (blau, rechts).

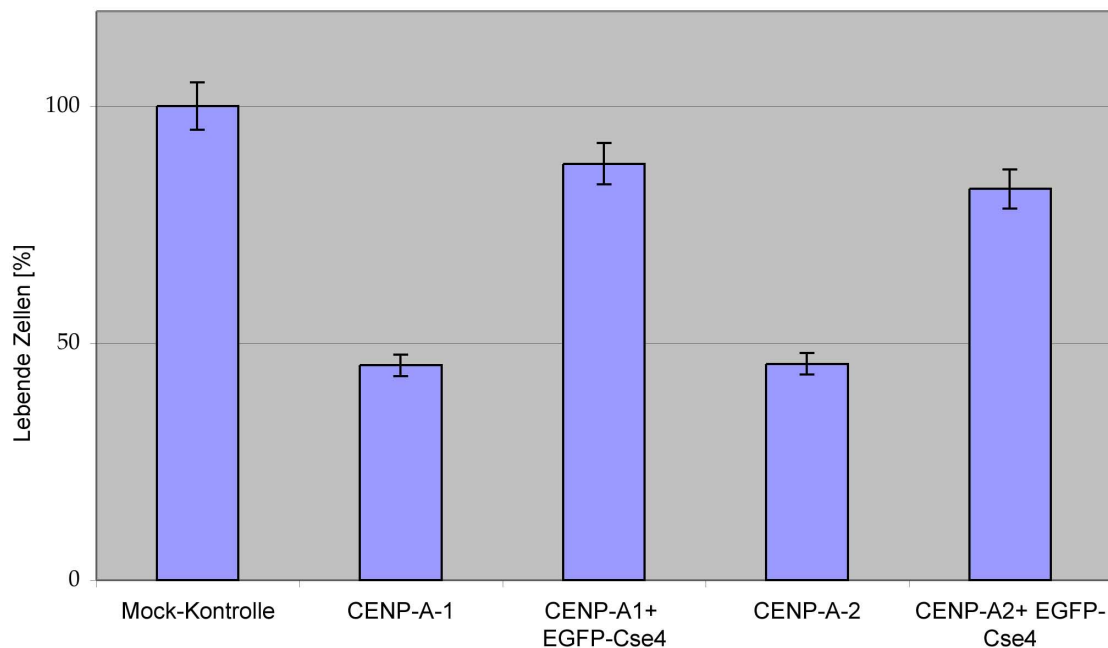
Nachdem gezeigt wurde, wie Zellen auf den Knockout von CENP-A reagieren, sollte nun untersucht werden, ob das Hefe-Protein Cse4 das homologe humane CENP-A funktionell ersetzen kann.

Humane Zellen, in denen vor der Transfektion der siRNAs gegen CENP-A das Cse4 der Bäckerhefe anwesend war, überstanden diesen „Angriff“ deutlich besser, es konnte eine stark erhöhte Überlebensrate festgestellt werden.

In HEp-2 Zellen wurde in diesem Experiment zuerst das Plasmid EGFP-Cse4 transfiziert. 12 Stunden nach dieser Transfektion erfolgte die zweite Transfektion, dieses Mal mit den doppelsträngigen siRNA-Konstrukten gegen die Ziel-Gen-Regionen CENP-A-1 bzw. CENP-A-2. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse dieser Analysen. In den Cse4-enthaltenden Zellen konnten für CENP-A-1 ( $89 \pm 5$  %) und für CENP-A-2 ( $83 \pm 5$  %) lebende Zellen bestimmt werden, jeweils relativ zu den Zellen der Mock-Kontrolle (siehe Abbildung 9). Diese Werte wurden nach der Zählmethode nach Neubauer (siehe oben) eruiert.

Die Ergebnisse ergeben sich als Mittelwert aus 3 voneinander unabhängigen Ansätzen.

Dieses Ergebnis steht in einem sehr deutlichen Kontrast zu den Zellen, die kein Cse4 enthielten. Dort konnten für den RNAi gegen CENP-A-1 nur ( $45 \pm 2$  %) und für RNAi gegen CENP-A-2 nur noch ( $46 \pm 2$  %) lebende Zellen, wieder relativ zur Mock-Kontrolle, gefunden werden (siehe Abbildung 9). Die Präsenz von EGFP-Cse4 in den überlebenden Zellen konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Die Zellen, die kein Trypanblau aufgenommen hatten, waren, bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm, grün. In einer Western-Blot Analyse von Lysaten dieser Zellen konnte EGFP-Cse4 von dem Antikörper gegen GFP erkannt werden (nicht gezeigt).



**Abb. 9: Cse4 ersetzt die Funktion von CENP-A;**

Lebend-Zell-Bestimmung nach NEUBAUER (Werte normiert auf Zellzahl der Mock-Kontrolle).

Humane Zellen wurden mit einem Plasmid, das die cDNA für das Fusions-Protein EGFP-Cse4 transient transfiziert. 12 Stunden danach wurden die RNAi-Oligos CENP-A-1 und CENP-A-2 in die Zellen eingebracht. Die Zellen wurden 72 Stunden nach der RNAi-Transfektion geerntet und mit Trypan-Blau gefärbt. Lichtmikroskopisch wurden dann lebende Zellen (farblos) und tote Zellen (blau) detektiert und gezählt.

„**Mock-Kontrolle**“, RNAi-Versuch mit H<sub>2</sub>O an Stelle eines siRNA-Oligos; „**CENP-A1**“, (CENP-A-Knockout mit Oligo CENP-A-1), „**CENP-A2**“, (CENP-A-Knockout mit RNA-Oligo CENP-A-2), zeigen Zellzahl nach Behandlung mit diesen siRNA-Duplices (siehe Text). „**CENP-A1 + EGFP-Cse4**“, (RNAi gegen CENP-A-1 nach Transfektion mit Cse4), „**CENP-A2 + EGFP-Cse4**“, (RNAi gegen CENP-A-2), zeigen die Zellzahl nach diesen Experimenten.

Die Zellen, deren RNAi-Phänotyp durch die Transfektion mit dem Cse4-Plasmid verhindert worden war, wurden außerdem noch immuncytologisch überprüft. In diesen Zellen wurden Färbungen gegen  $\beta$ -Tubulin durchgeführt. Die DNA der Zellen wurde mit DAPI angefärbt. Eine Färbung der Centromere wurde nicht durchgeführt, da EGFP-Cse4 an Kinetochoren lokalisiert. Diese lebenden Zellen mit EGFP-Cse4-Fluoreszenz zeigten keine mitotischen Probleme, wie sie zuvor bei Zellen beobachtet worden waren, bei denen CENP-A durch RNAi herunterreguliert war (nicht gezeigt). Wenn man die Reihenfolge der Transfektionen umkehrt, also zuerst das siRNAi-Oligo zu den Zellen gibt, und erst danach eine Transfektion mit Cse4 erfolgte, war es den Zellen unmöglich, sich von dem CENP-A-„Knockout“ zu erholen. Hier wurden prozentual noch deutlich weniger lebende Zellen ermittelt (nicht gezeigt).

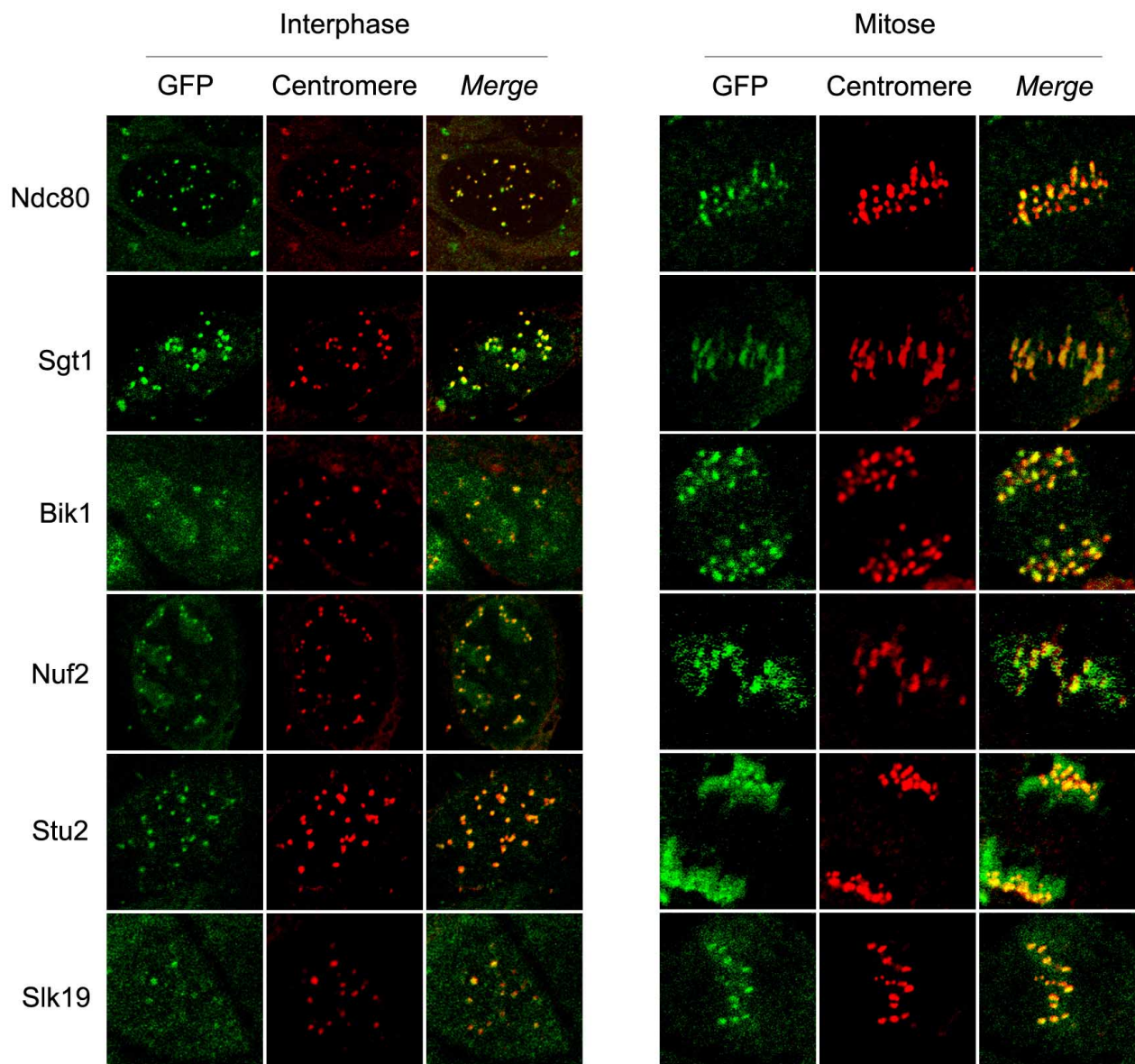
### 3.4. Analyse weiterer konservierter *Saccharomyces-cerevisiae*-Kinetochor-Proteine in menschlichen Zellen

Zu wichtigen konservierten Kinetochor-Proteinen der Bäckerhefe existieren humane Protein-Homologe (siehe Einleitung und Tabelle 13). Die hier untersuchten Proteine waren Ndc80-Hec1, Sgt1, Bik1, Nuf2, Stu2 und Slk19. Auch diese cDNAs für die Proteine wurden als ebenfalls in Fusion mit EGFP transient in HEp-2-Zellen transfiziert und exprimiert.

Dazu wurden die Zellen der stabilen Zelllinien fixiert und konfokal-mikroskopisch analysiert (siehe Abbildung 10). Abb. 10 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Gezeigt ist jeweils eine konfokale Ebene eines Zellkerns einer menschlichen Zelle. EGFP-Ndc80-Hec1, EGFP-Sgt1, EGFP-Bik1, EGFP-Nuf2, EGFP-Stu2 und EGFP-Slk19 lokalisieren sowohl in Interphase-Zellkernen als auch in Mitose-Zellen an denselben Stellen (grün), die durch Antikörperfärbung von endogenen Centromerproteinen angefärbt werden (rot). Die Übereinanderlagerung der beiden Signale ergibt die Mischfarbe gelb („Merge“). Die Vorgehensweise war identisch zu der für Cse4, Mif2 und Okp1 beschriebenen (siehe 3.2.). Statistische Untersuchungen demonstrierten, dass auch diese Proteine spezifisch an das humane Kinetochor binden (siehe Tabelle 13).

Zwei dieser Proteine (Bik1 und Slk19) zeigten zwar in der Interphase eine klare Kolokalisation mit den Kinetochoren der menschlichen Zellen, die Signale waren aber signifikant schwächer.





**Abb. 10: Analyse von der Lokalisation von EGFP-Ndc80, -Sgt1, -Bik1, -Nuf2, -Stu2 und -Slk19 in menschlichen Zellen während der Interphase und der Mitose**

**Links: Zellen in der Interphase, Rechts: Zellen in der Mitose**

Plasmide, die die cDNA für die Fusionsproteine EGFP-Ndc80, -Sgt1, -Bik1, -Nuf2, -Stu2 und -Slk19 enthielten, wurden transient in menschliche HEp-2-Zellen transfiziert. Transfizierte Zellen auf Deckgläschen wurden fixiert und ihre Centromere durch Immun-Fluoreszenz markiert. Die Abbildungen zeigen jeweils eine konfokale Ebene (ca. 0,5  $\mu\text{m}$  Schichtdicke) einer Zelle. Die Signale des GFP-Fusionsproteins entstehen dabei durch die Fluoreszenz des GFPs (Anregung bei 488 nm), die der Centromere durch einen Rhodamin-gekoppelten sekundären  $\alpha$ -human-Antikörper (Exc.: 543 nm). Die roten und grünen Signale wurden übereinandergelagert („Merge“).



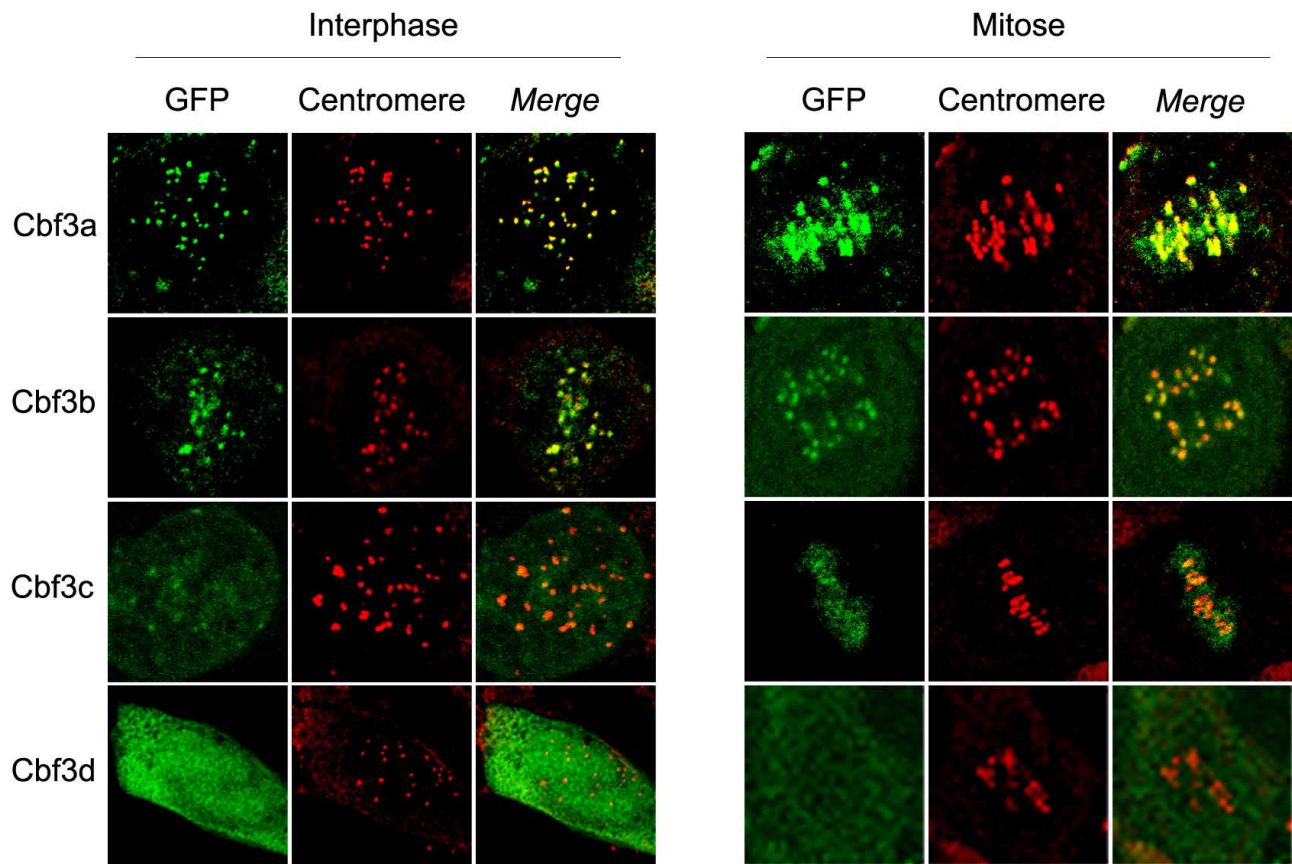
### 3.5. Analyse von nicht sequenz-konservierten *S. cerevisiae*-Kinetochorproteinen in menschlichen Zellen

Der CBF3-Komplex ist der zentrale Bestandteil des Kinetochors der Bäckerhefe. Null-Mutationen von Bestandteilen dieses Komplexes (Cbf3a, b, c und d) führen zum Tod der Zellen. Mit Ausnahme von Cbf3d (Skp1) sind keine Homologen zu diesen Proteinen im Menschen bekannt. Die cDNAs der Proteine Cbf3a, Cbf3b, Cbf3c wurden als Fusions-Plasmide mit EGFP in HEp-2-Zellen transfiziert und nach Expression konfokal-mikroskopisch analysiert.

EGFP-Cbf3a, EGFP-Cbf3b und EGFP-Cbf3c lokalisieren an den Kinetochoren menschlicher Zellen. Die Proteine zeigten sowohl in der Interphase als auch in der Mitose die gleiche Verteilung wie die endogenen humanen Centromere. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse dieser konfokal-mikroskopischen Analysen. Gezeigt werden jeweils einzelne konfokale Ebenen der Zellen. Die Bilder zeigen auch, dass die Signale bei der Aufnahme der EGFP-Cbf3c deutlich kleiner sind als die der anderen Proteine dieser Gruppe (siehe Abbildung 11 und Diskussion).

Ein weiteres Mitglied des CBF-Komplexes ist Cbf3d. Cbf3d hat eine starke Sequenz-Homologie zum humanen Skp1-p19 [Zhang H. *et al.* (1995)] (siehe Tabelle 13). Ein Vergleich der Strukturen der beiden Proteine durch molekulares Modelling zeigte, dass beide auch eine nahezu identische Struktur haben (Hillisch, Wieland und Diekmann, noch unpublizierte Daten).

Die cDNA von Cbf3d wurde wiederum als Fusion mit EGFP präpariert, in Zellen exprimiert. Wie auf Grund der vielfältigen Funktionen seines humanen Homologen erwartet, war Cbf3d nur diffus im Zellkern zu detektieren (siehe Abbildung 11). Es ist gut möglich, dass die Kinetochore auch als Bindestellen genutzt werden, jedoch wurde Cbf3d nicht lokal an diesen Stellen angereichert gefunden.



**Abb. 11: Analyse der Lokalisation von EGFP-Cbf3a, -Cbf3b, -Cbf3c und -Cbf3d in menschlichen Zellen während der Interphase und der Mitose**

**Links: Zellen in der Interphase, Rechts: Zellen in der Mitose.**

Plasmide, die die cDNA für die Fusionsproteine EGFP-Cbf3a, -Cbf3b, -Cbf3c und -Cbf3d enthielten, wurden transient in menschliche HEP-2-Zelle transfiziert. Transfizierte Zellen auf Deckgläschen wurden fixiert und ihre Centromere durch Immun-Fluoreszenz markiert. Die Bilder zeigen jeweils eine konfokale Ebene (ca. 0,5  $\mu$ m Schichtdicke) einer Zelle. „Merge“: Überlagerung der GFP- und Centromersignale

### 3.6. Statistische Auswertung der Lokalisationsstudien

Für die konfokal-mikroskopische Analyse von jedem der in den Vorexperimenten beschriebenen Fusionsproteine wurden zwischen 100 und 200 Zellen untersucht. Nach der transienten Transfektion der cDNAs in HEP-2-Zellen wurden die Centromere der Zellen mit Antikörpern gegen konstitutive Kinetochor-Proteine (ACA-Seren) sichtbar gemacht. Tabelle 13 zeigt das Resultat dieser statistischen Auswertung. Kinetochor-Proteine der Hefe binden mit Ausnahme von Cbf3d hoch spezifisch an das Centromer humaner Zellen. Die Werte der Kolokalisation mit den Centromeren bewegen sich in einem Rahmen von 38 % bis 86 %. Das zur Kontrolle analysierte humane Protein CENP-A zeigte zu 65 Prozent eine Kolokalisation mit den Centromeren, die durch

Antikörperfärbung von endogenen Centromer-Proteinen detektiert wurden. Diese transient transfizierten Zellen zeigten jedoch eine Überexpression von 28 %.

In konfokal-mikroskopischen Aufnahmen wurde die Gesamtzahl der transfizierten Zellen bestimmt, welche GFP-Fusionsproteine exprimierten. Dieses ist in der Tabelle 13 als „Gesamtzahl der Zellen“ angegeben. Nicht transfizierte Zellen lieferten keinen Beitrag zu dieser Menge. Die Anzahl der Zellen der grün fluoreszierenden Zellen wurde in Beziehung zu der Gesamtzahl aller Zellen auf dem Objekträger gestellt und ist in Tabelle 13 als „Transfektions-Effizienz“ zu erkennen. Die Effizienz der Transfektion konnte bestimmt werden und bewegte sich zwischen 50 und 90 Prozent. Nur in zwei Fällen (Okp1 und Cbf3a) lag die Effizienz mit 20-40 Prozent deutlich niedriger. Die analysierten Zellen wurden auf den Deckgläschen nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Dabei wurden die mit dem DNA-Farbstoff DAPI behandelten Zellen nur mit dem UV-Licht der HBO-100 Lampe des Mikroskops beobachtet und dann dort (hier ist keine GFP-Fluoreszenz zu sehen) die ausgewählt, welche mit dem CLSM vermessen wurden. Die konfokal-mikroskopische Analyse erfolgte immer nach einem einheitlichen Scan-Verfahren. Jede dieser Zellen wurde untersucht. Zellen, in denen die GFP-Signale so stark waren, dass sie alles überstrahlten, sind in der Tabelle 13 in der Spalte „Überexpression“ zu finden.

Kinetochor-Lokalisation der GFP-Proteine in solchen Zellen kann nicht ausgeschlossen werden, jedoch findet man die Proteine in diesen Zellen auch an anderen Stellen.

**Tabelle 13:** Statistik der Lokalisation der untersuchten EGFP-Fusions-Proteine von Kinetochor-Proteinen der Bäckerhefe in humanen Zellen.

Protein (EGFP- Fusion)	Homologe Proteine des Menschen	Homologie der Proteine (%)	Zugangs- Nummer der Datenbank (Hefeprotein)	Trans- fektions- Effizienz	Gesamt- zahl (n)	Kolokal. mit ACA (%)	Über- Expression (%)	Diffuse Expression (%)
Cse4	<a href="#">CENP-A</a>	65	P36012 (P)	ca. 80-90	214	75	21	4
Mif2	<a href="#">CENP-C</a>	45	P35201 (P)	ca. 70-80	132	86	11	3
Okp1	<a href="#">CENP-F</a>	35	YGR179C (S)	ca. 20-40	121	50	17	25
Ndc80- Hec1	<a href="#">Nuf2/</a> <a href="#">Ndc80</a>	36	YIL144W (S)	ca. 70-80	146	69	21	10
Sgt1	<a href="#">hSgt1</a>	42	Q08446 (P)	ca. 70-80	136	82	15	3
Bik1	<a href="#">CLIP-170</a>	46	P11709 (P)	ca. 70-80	151	55	18	27
Nuf2	<a href="#">hNuf2</a>	40	P33895 (P)	ca. 70-80	125	72	0	28
Stu2	<a href="#">Ch-TOG</a>	24	YLR045C (S)	ca. 50-60	102	43	20	37
Slk19	<a href="#">CENP-F</a>	38	YOR195W (S)	ca. 50-60	162	86	1	13

<b>Cbf3a</b>	-	-	P32504 (P)	ca. 20-30	130	66	21	13
<b>Cbf3b</b>	-	-	P40969 (P)	ca. 80-90	205	38	11	51
<b>Cbf3c</b>	-	-	P35203 (P)	ca. 70-80	117	74	12	14
<b>Cbf3d</b>	Skp1	60	P52286 (P)	ca. 70-80	151	NULL	13	87
<b>humanes CENP-A</b>	S.c. Cse4	65	P49450 (P)	ca. 80-90	128	65	28	6

Die Zugangs-Nummern zu den Protein-Datenbanken sind im Internet in der „*Saccharomyces cerevisiae* Genome Database SGD“ an der Stanford University, USA (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) (in der Tabelle mit (S) gekennzeichnet) oder in der „*SWISS PROT Protein Datenbank*“ (<http://us.expasy.org/sprot/>) (in der Tabelle mit (P) gekennzeichnet) veröffentlicht und frei zugänglich.

In der untersten Zeile sind zusätzlich die Ergebnisse der Analyse für ektopisch eingebrachtes humanes CENP-A als EGFP-Fusionsprotein gezeigt (transient transfiziert), um die Ergebnisse für die Hefeproteine mit einem konstitutiven Protein des Menschen zu vergleichen.

Benannte Homologien wurden der Literatur (siehe Einleitung, Tabellen 1 und 2) entnommen, wurden jedoch auch mit BLAST-P (Frei zugänglich im Internet unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) überprüft.

### 3.7. Kontrollen

Um die oben beschriebenen Daten zu validieren, wurden zusätzliche Kontrollen durchgeführt.

Zunächst wurden Zellen, die EGFP-Fusions-Proteine exprimierten, aber **ohne** Centromerfärbung untersucht. Dabei waren punktförmige Signale in gleicher Größe, Form, Menge und Helligkeit zu sehen wie in Abbildung 9-12 (nicht gezeigt). Daher konnten diese Daten nicht aus einem „*Crosstalk*“ (Durchbluten eines Signals aus einem Kanal in einen Anderen) mit den ACA-Signalen des anderen Kanals resultieren.

Außerdem wurde, wie im Methodenteil beschrieben, der „*Multitrack*“-Modus des Zeiss LSM-510 benutzt, bei dem die einzelnen Kanäle sequenziell abgelesen werden. Hier war jeweils immer nur ein Laser aktiv. Außerdem wurden enge Band-Pass-Filter eingesetzt.

Als weitere Kontrolle wurde ein Fusions-Plasmid, EGFP-PML, in die HEp-2 Zellen transfiziert, das für ein nicht am Kinetochor lokalisiertes humanes Kern-Protein, PML, kodiert. PML ist ein Bestandteil von „*PML-Körperchen*“ [Hemmerich *et al.* (2000b)], nukleären Kompartimenten mit mehreren spezifischen Funktionen, die aber nie mit den Kinetochore koloalisieren [Kiesslich *et al.* (2002)]. Diese Zellen zeigten jeweils zwischen 6 und 10 grüne PML-Bodies, deren Signale aber keinerlei farbliche Überlappung mit den ACA-Signalen aufwiesen (nicht gezeigt).

Die Kontrollen zeigen, dass die GFP-Signale der Hefe-Kinetochor-Proteine an den menschlichen Centromeren durch spezifische Rekrutierung dieser Proteine zustande kommt.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde analysiert, wie sich Kinetochor-Proteine der Bäckerhefe *S. cerevisiae* bezüglich ihrer Lokalisation in humanen Zellen verhalten. Untersucht wurde dies für 13 Proteine. Für eines der Proteine (Cse4) wurde darüber hinaus geprüft, ob es die Funktion seines menschlichen Homologs ersetzen kann.

Auf Grund der Ergebnisse können diese in drei Gruppen eingeteilt werden:

### 4.1. Proteine des Kinetochors der Hefe mit humanen Homologen

Mit der Ausnahme von **Cbf3d** konnte festgestellt werden, dass alle untersuchten *S. cerevisiae* Proteine dieser Gruppe, **Cse4, Bik1, Mif2, Ndc80-Hec1, Nuf2, Okp1, Sgt1 und Slk19** an Kinetochoren der Zellen rekrutiert werden. Die meisten dieser Proteine haben Sequenz-Homologie zu humanen Kinetochor-Proteinen. Daher kann man davon ausgehen, dass diese homologen Bereiche Sequenz-Domänen beinhalten, die diese Bindung fördern, und dass die Hefe-Kinetochor-Proteine ähnliche Bindungsstellen bzw. Proteine erkennen und binden.

**Cse4** zeigt eine hohe Sequenzhomologie zum humanen CENP-A [Basrai *et al.* (1995), Meluh *et al.* (1998)]. Beide Proteine sind in ihrem Organismus Homologe des Histons H3, welches sie in den Nukleosomen in der Centromer-Region ersetzen [Stoler *et al.* (1995)]. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass diese Proteine in allen Phasen des Zellzyklus ausschließlich Koloakalisation aufweisen.

Diesen Beobachtungen bestätigen und erweitern die Ergebnisse von S. Henikoff, dessen Arbeitsgruppe zeigte, dass ektopisch transfiziertes Cse4 in humanen HeLa-Zellen überwiegend am pericentromerischen Heterochromatin (das Heterochromatin, welches sich zu beiden Seiten an das Centromer anschließt) zu finden ist und am Centromer selbst [Henikoff *et al.* (2000)].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Cse4 ausschließlich an Centromere, sowohl in der Interphase als auch in der Mitose, lokalisiert.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich die Abweichung zwischen den Henikoff-Daten und den hier vorgestellten Daten nicht aus den unterschiedlichen Konstrukten ableiten lässt (Henikoff *et al.* verwendeten GFP-

Plasmide in denen das GFP am C-Terminus von Cse4 hängt, im pEGFP ist es am N-Terminus angeknüpft).

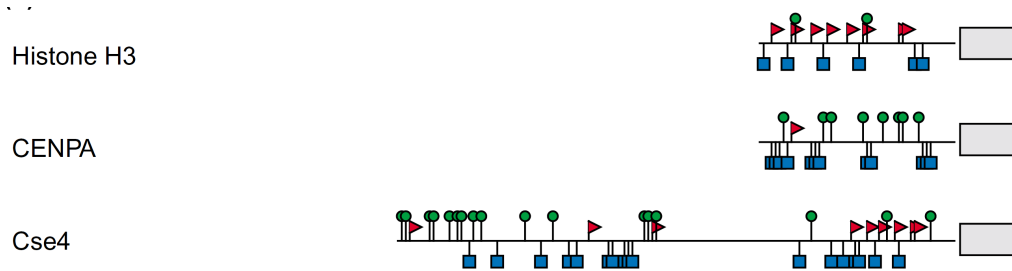
Wenn HEp-2-Zellen analysiert werden, die sehr starke GFP-Fluoreszenz (Überexpression) zeigen, konnte, wie bei Henikoff et al. beschrieben, ebenso eine nur diffus nukleäre und pericentromerische Lokalisierung beobachtet werden.

Daher kann der Schluss gezogen werden, dass die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen eine Frage der Expressions-Stärke ist. Wenn Zellen mit besonders niedriger Expression von EGFP-Cse4 oder Zellen der stabilen Zelllinie für dieses Protein konfokalmikroskopisch untersucht wurden, konnte eine distinkte und ausschließliche Bindung von Cse4 an das Kinetochor menschlicher Zellen gezeigt werden. Am pericentromerischen Heterochromatin werden bei niedriger Expressionsrate keine Signale detektiert.

Interessanter Weise waren Experimente, die das Ziel hatten, mit dem humanen CENP-A die Temperatur-sensitiven oder Null-Allele der Bäckerhefe wiederherzustellen, **nicht** erfolgreich (Keith, Stoler, Fitzgerald-Hayes, nicht publiziert, in [Stoler *et al.* (1995)]). Trotzdem mutmaßen die Autoren in der selben Publikation, dass Cse4 und CENP-A in den beiden Organismen dieselbe Funktion haben.

Der nicht homologe N-Terminus, der bei Cse4 deutlich länger ist als beim Histon-H3 und bei CENP-A ist jedoch „nur“ für Regulations-Zwecke nötig [Smith (2002)] (siehe Abbildung 12).

Zur Lokalisierung der Proteine am Kinetochor scheint ausschließlich die jeweilige, 39 Aminosäuren lange, carboxy-terminale Histon-Faltungs-Domäne (HFD) nötig und ausreichend zu sein [Sullivan (2001)]. Protein-Chimären, die den C-Terminus von CENP-A an die HFD von Histon H3 banden, konnten nicht am Centromer gefunden werden. Wenn man jedoch den N-terminalen Histon-Schwanz von H3 an die HFD von CENP-A fusioniert, so bindet dieses Protein ans Centromer [Wells *et al.* (1989)].



**Abb. 12: Schematischer Aufbau der Histon-H3 Varianten,** oben ist das Protein H3 des Menschen zu sehen, in der Mitte ist CENP-A dargestellt, welches H3 in Nukleosomen am Centromer ersetzt, unten ist Cse4 gezeigt, das zu CENP-A homologe Protein der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Die Histon-Faltungs-Domäne ist als graue Box zu erkennen. Wahrscheinliche posttranslationale Modifikations-Stellen sind gekennzeichnet:  
 Lysin-Reste: rote Flaggen  
 Serin-Reste: grüne Punkte  
 Arginin-Reste: blaue Quadrate; (Bild verändert nach [Smith (2002)])

Die Domäne von Cse4, die für die Bindung an das Centromer absolut essenziell ist, ist ebenfalls die HFD [Ortiz *et al.* (1999)]. Diese ist zu 64% homolog zu der C-terminalen Faltungs-Domäne von Histon H3 [Sullivan (2001)].

**Mif2** enthält als funktionelle Domäne den *AT-Hook*, ein unspezifisches DNA-Bindungs-Motiv, welches an AT-reiche Sequenzen bindet [Meluh *et al.* (1995), (1997)]. Dieses Protein hat eine Homologie zum humanen Kinetochor-Protein CENP-C.

Beide Proteine sind DNA-bindende Proteine [Meluh *et al.* (1997), Sugimoto *et al.* (1997), Yang *et al.* (1996)]. CENP-C bindet spezifisch an  $\alpha$ -Satelliten-DNA des Centromers [Trazzi *et al.* (2002)]. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Mif2 an Centromeren der menschlichen Zellen lokalisiert.

**Okp1** ist in der Hefe ein Teil des Okp1-Komplexes, der eine ganze Reihe von Kinetochor-Proteinen der Bäckerhefe als Bindungspartner hat [Ortiz *et al.* (1999)].

Es hat in mehreren Bereich Homologie zum humanen Protein CENP-F. Auch für Okp1 konnte eine nahezu komplette Rekrutierung an das Kinetochor gezeigt werden. Jedoch bindet Okp1 sowohl in der Interphase, als auch in der Mitose an das Kinetochor, während CENP-F nur in der Mitose eine Rolle im Kinetochor menschlicher Zellen spielt [Rattner *et al.* (1993)]. Vermutlich hat CENP-F eine in Okp1 nicht konservierte Domäne, die die Funktion hat, das wesentlich größere CENP-F am humanen Kinetochor an seinen Interaktionspartner CENP-E zu binden, mit dem es zusammen nach der Mitose proteolytisch abgebaut wird [Chan, G. K. *et al.* (1998)].



**Sgt1** interagiert mit Cbf3d in seiner Funktion, Cbf3c zu aktivieren, indem es eine Kinase rekrutiert, die dieses phosphoryliert. Es hat sehr hohe Sequenz-Homologie zum hSgt1, von dem angenommen wird, dass es eine vergleichbare Rolle in menschlichen Zellen übernimmt [Kitagawa *et al.* (1999)]. Obwohl Sgt1 wie Cbf3d (siehe unten) eine mehr allgemeine modifizierende Rolle am Kinetochor der Hefe hat, konnte es, im Gegensatz zu Cbf3d, in dieser Arbeit doch am humanen Kinetochor nachgewiesen werden.

**Cbf3d**, in der Bäckerhefe Teil des Cbf3-Komplexes, hat mit dem SKP1-p19 ein homologes Protein beim Menschen [Lechner *et al.* (1991)]. Modellierungs-Studien (Hillisch, v. Langen, Wieland & Diekmann, nicht publiziert) deuteten an, dass beide Protein eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur haben. Zusammen mit Sgt1 rekrutiert Cbf3d eine Kinase ans Kinetochor, die dann Cbf3c phosphoryliert und zur Bindung an CDEIII befähigt. Cbf3d bindet aber auch noch an Cdc4 und initiiert damit den von Ubiquitin abhängigen Abbau von Cbf3c und damit den Zerfall des essenziellen Cbf3-Komplexes [Kaplan *et al.* (1997)].

In dieser Arbeit wurde Cbf3d als GFP-Fusions-Protein analysiert und konnte gleichförmig verteilt im Zellkern gefunden werden (siehe Abb. 13), eine Beobachtung, die wegen der vielfältigen Rollen dieses Proteins nicht überrascht.

**Bik1** [Lin *et al.* (2001)] und sein humanes Homolog CLIP-170 [Pierre, 1992 #17678; Pierre, 1994 #17685] binden beide spezifisch an den Plus-Enden von Mikrotubuli, zumeist im Cytoplasma. In der Mitose (zwischen Prometa- und Telophase) binden sie dann auch an die Spindel-Mikrotubuli des Kinetochors. In den humanen Zellen bindet Bik1 in der Interphase und Mitose an das Centromer. Die Stärke der Signale in der Interphase sind jedoch deutlich schwächer

Von **Nuf2** [Nabetani *et al.* (2001), Wigge *et al.* (2001)] nimmt man an, dass es an der Bindung der Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor beteiligt ist. Außerdem wird für das Protein noch eine Rolle bei der Kontrolle des Spindel-Checkpoints postuliert. Das humane Homolog ist hNuf2. In dieser Arbeit lokalisierte Nuf2 ausschließlich am humanen Centromer.

Wie Nuf2, so ist auch **Stu2** [He, X. *et al.* (2001), Kosco *et al.* (2001)] an der Bindung der Spindel-Mikrotubuli beteiligt. Das humane Homolog Ch-Tog [Wigge *et al.* (2001)] hat im humanen Nukleus eine analoge Funktion. Auch Stu2 konnte, wenn auch etwas diffus, sehr spezifisch am Kinetochor nachgewiesen werden.



**Slk19** interagiert in der Bäckerhefe mit dem Motorprotein Kar3 und stabilisiert die Kopplungsstelle zwischen den Motorproteinen und den Mikrotubuli [Zeng *et al.* (1999)]. Es ist homolog zum humanen CENP-F. Es wird angenommen, dass beide Proteine ähnliche Rollen spielen. Slk19 konnte ebenfalls am Kinetochor von HEp-2-Zellen nachgewiesen werden.

**Ndc80-Hec1** ist Teil eines größeren Komplexes am Kinetochor der Bäckerhefe [Wigge *et al.* (2001)]. Es interagiert dort vor allem mit Nuf2. Das humane Homolog hHec1 ist am Spindel-Checkpoint beteiligt und bindet in humanen Zellen an das Kinetochor [Martin-Lluesma *et al.* (2002)]. Auch Ndc80-Hec1 wurde analysiert und am Kinetochor gefunden.

Dieses ist nach derzeitigem Kenntnisstand die erste Arbeit, die Ergebnisse dieser Art zeigt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hefe-Proteine ihren menschlichen Gegenspielern wesentlich ähnlicher sein müssen als die niedrige Homologie auf Sequenz-Ebene das vermuten ließe. Das aber bedeutet, dass auch die Architektur des Kinetochors, so unterschiedlich sie auf den ersten Blick auch scheint, bei der Bäckerhefe und beim Menschen deutlich mehr Gemeinsamkeiten haben muss. Ergebnisse wie diese deuten darauf hin, dass Struktur-Homologie nicht nur durch die Abfolge der Aminosäuren der Primärsequenz festgelegt wird. Subtile Protein-DNA- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen bauen vermutlich bei allen Eukaryoten ein ähnliches Netzwerk auf. Die grundlegende Funktion ist ja identisch: Korrekte Weitergabe der genetischen Information an die nächste Generation.

## 4.2. Hefe-Proteine ohne humane Homologe

Zusätzlich zu den eben diskutierten Hefe-Kinetochor-Proteinen, von denen im Menschen homologe Proteine bekannt sind, wurden auch die restlichen Proteine des absolut essenziellen Cbf3-Komplexes untersucht.

Völlig unerwartet binden Cbf3a, Cbf3b und Cbf3c an das Kinetochor menschlicher HEp-2 Zellen.

Die deutlich schwächeren Signale von Cbf3c legen die Vermutung nahe, dass diesem Protein (vor der Bindung in der Hefe muss es durch Phosphorylierung aktiviert werden) sein Interaktions-Partner fehlt.

Offensichtlich finden diese Proteine spezifische Bindungsstellen entweder auf der Centromer-DNA des Menschen oder an dort lokalisierten Proteinen. Da die GFP-Signale der Proteine am Kinetochor deutlich, stark und sehr spezifisch waren, kann gefolgert werden, dass es sich nicht um Artefakte handelte. Die Kontroll-Experimente unterstützen diese These ebenfalls.

Im Gegensatz dazu kann spekuliert werden, dass es auch bis jetzt noch nicht bekannte, humane Proteine gibt, die an diesen Stellen lokalisiert sind. Diese Proteine könnten eine sehr ähnliche Funktion am humanen Kinetochor haben, wie der Cbf3-Komplex in der Bäckerhefe. Es ist aber nicht unbedingt zu erwarten, dass sie eine hohe Sequenz-Homologie aufweisen.

Auch diese Ergebnisse unterstützen den aus allen Ergebnissen dieser Arbeit zu erkennenden Zusammenhang, dass der Kinetochor-Komplex im Eukaryoten-Reich weitaus stärker konserviert ist als es bis jetzt reine Homologie-Vergleiche auf Sequenz-Basis vermuten ließen.

Das Protein **Cpf1** spielt eine wichtige, wenn auch nicht essenzielle Rolle am Kinetochor der Bäckerhefe ([Cai *et al.* (1990), Hemmerich *et al.* (2000a), Wieland *et al.* (2001)]. Außer seiner Rolle am Centromer hat es jedoch noch eine zusätzliche Funktion als Transkriptionsfaktor im Met-Operon der Hefe [Kuras *et al.* (1997)]. Da wegen des häufigen Vorkommens der Bindungsstellen im ganzen Genom keine spezifische Bindung am humanen Kinetochor erwartet werden konnte, wurde nicht überprüft, wohin Cpf1 in menschlichen HEp-2 Zellen rekrutiert wird.

### 4.3. Cse4 ersetzt CENP-A funktionell

Centromer-DNA unterscheidet sich vom gesamten restlichen Genom dadurch, dass dort die Histon-H3-Dimere durch spezielle Centromer-Histon-Varianten ersetzt werden. Diese, zueinander hoch homologen, Proteine wurden zunächst beim Menschen (CENP-A) und bei der Bäckerhefe (Cse4) gefunden, es scheint sie aber in allen Eukaryoten zu geben [Henikoff *et al.* (2000)].

Sowohl für CENP-A als auch für Cse4 wurden im Rahmen dieser Arbeit GFP-Fusions-Proteine hergestellt. In ausführlichen Analysen konnte dargelegt werden, dass beide in HEp-2-Zellen hoch spezifisch an das humane Kinetochor binden.

Henikoff *et al.* [Henikoff *et al.* (2000)] fusionierten GFP an den C-Terminus des Hefe-Proteins Cse4. Sie fanden, dass es sowohl an Kinetochor, als auch an pericentromerisches

Heterochromatin bindet. Für Zellen, die eine Überexpression von Cse4 zeigen, konnte dies in dieser Arbeit bestätigt werden. Zellen, die das Fusions-Protein schwach exprimieren, zeigen Cse4 ausschließlich am Kinetochor.

Diese Beobachtung korreliert gut mit dem Verhalten von CENP-A: Bei Überexpression findet man das Protein unspezifisch im Zellkern verteilt, wobei die spezifische Bindung an die Kinetochore verloren geht (Wieland, G., nicht publiziert; [Shelby *et al.* (1997)])

Zellen aus stabilen Zelllinien, wie sie für Cse4, Mif2, Okp1, für humanes CENP-A und andere Hefe-Kinetochor-Proteine hergestellt wurden, exprimierten die Proteine in konstanter, moderater Weise. In solchen Zellen konnten die Proteine nur am Kinetochor detektiert werden.

Wenn man in humane Zellen siRNA-Doppelstränge einführt, so wird die Menge an CENP-A stark reduziert, wie Western-Blot-Analysen der so behandelten Zellen nachweisen. Die Ergebnisse stimmen gut mit kürzlich von Goshima *et al.* publizierten überein [Goshima *et al.* (2003)].

Auf zweierlei Weise wurden der Zustand der Zellen („DAPI-Zell-Assay“) und die Gesamtzahl der Zellen bestimmt, die den Knockout von CENP-A überlebten. Beide Methoden ergaben einen Wert von 40 Prozent, der den von Goshima *et al.* [Goshima *et al.* (2003)] publizierten Daten gleicht.

Die Daten aus Goshima *et al.* stehen aber nicht in Konkurrenz zu den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen, da die Versuche eine völlig andere Zielrichtung hatten. Diese Arbeitsgruppe stellt ein neues Kinetochorprotein des Menschen vor, hMis12, und der CENP-A-Knockout ist Teil ihres Ansatzes, zu zeigen, wann dieses Protein an das Kinetochor rekrutiert wird und an welche anderen Proteine es dort bindet. Insofern stellen diese Daten nur eine unabhängige externe Kontrolle der vorliegenden Daten dar [Goshima *et al.* (2003)].

Schon mehrfach war für unterschiedliche Organismen ein Herunterregulieren von CENP-A und die daraus resultierenden Phänotypen beschrieben worden. Die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* zeigt nach einem Knockout von SpCENP-A (Cnp1) normale Mitose-Raten, wenn auch stark vermehrte Mitose-Fehler, die in Aneuploidie und dem Absterben der Tochterzellen gipfelten [Takahashi *et al.* (2000)].

In *Caenorhabditis elegans* konnte gezeigt werden, dass ein RNAi gegen das zu CENP-A homologe Protein, das „holozentrische Protein 3 (HCP-3) letal ist [Buchwitz *et al.* (1999)].

Auch Knockout-Mäuse (*Mus musculus*), die CENP-A nicht exprimieren können, zeigen einen letalen Phänotyp im sehr frühen Embryonal-Stadium, der wiederum mit massiven Fehlern bei der Trennung der Chromosomen einhergeht [Howman *et al.* (2000)].

---

Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass es bei einer normalen, funktionierenden Chromatiden-Teilung und einem problemlosen Verlauf der Mitose, an erster Stelle auf ein funktionsfähiges CENP-A oder eines seiner Homologen ankommt.

Obwohl die Histon-H3-Proteine bei den Eukaryoten extrem konserviert sind, so gehören doch die Centromer-DNA und mit ihr die H3-Varianten wie CENP-A/Cse4 zu den evolutionär aktivsten Loci auf den Chromosomen [Henikoff *et al.* (2001), Henikoff (2002), Henikoff *et al.* (2002)].

Um so erstaunlicher ist das Ergebnis, dass die Histon-H3-Variante Cse4 der Bäckerhefe mit dem kleinsten, ja minimalistisch zu nennenden Kinetochor in der Lage ist, das CENP-A des Menschen mit der komplexesten, am höchsten regulierten molekularen Maschine dieser Art, funktionell zu ersetzen.

Dieser Ansatz und ein solcher Versuch wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig erfolgreich durchgeführt.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Kinetochor-Proteine aus der Hefe *S. accharomyces cerevisiae* wurden in Fusion mit dem "Green-Fluorescent-Protein" (GFP) in menschlichen Zellen zur Expression gebracht.

Die GFP-Fusionsproteine wurden dann bezüglich ihrer Lokalisation und Funktion im Vergleich zum endogenen (humanen) Protein homolog untersucht. Zu diesem Zweck wurden neunzehn Hefe-Centromerproteine in menschlichen Zellen bezüglich ihrer Lokalisation analysiert.

Erwartungsgemäß lokalisierten solche Hefe-Centromerproteine, deren Aminosäure-Sequenz im Vergleich zum menschlichen Homolog stark konserviert sind, an den menschlichen Centromeren.

Erstaunlicherweise konnte aber im Rahmen dieser Arbeit erstmals auch gezeigt werden, dass nicht-konservierte Hefe-Centromerproteine an das humane Centromer rekrutiert werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die Information zur Rekrutierung oder zum Einbau eines Proteins an bzw. in einen Multiproteinkomplex nicht ausschließlich durch die Primärsequenz des Proteins festgelegt ist.

Zur Analyse der biologischen Bedeutung dieser Beobachtungen wurde das konservierte humane Protein CENP-A, welches in den Nukleosomen der Centromer-Region das Histon-H3 ersetzt, durch die RNAi-Technik ausgeschaltet. Dies führte zu Fehlern bei der Zellteilung, gefolgt vom Zelltod. Durch ektopische Expression von Cse4, des homologen Proteins der Bäckerhefe, in RNAi-behandelten Zellen konnte der letale Phänotyp überwunden werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass dieses Centromerprotein der Hefe *S. cerevisiae* die Funktion seines Homologen in der menschlichen Zelle ersetzen kann. Das erstmals etablierte Testsystem stellt ein neues Verfahren zur funktionellen Analyse von Protein homologen verschiedener Spezies dar und bietet eventuell einen Schlüssel zum Verständnis des komplexen Kinetochors des Menschen.

Weitere Untersuchungen sollten nun an diese Ergebnisse anschließen, um zu eruieren, ob weitere Hefe-Proteine Homologe des Menschen ersetzen können. Die Ergebnisse für die Cbf3 Proteine zeigen einen Weg für die Suche nach weiteren wichtigen Bestandteilen des menschlichen Kinetochors. Außerdem wäre es wünschenswert, Proteine aus dem Kinetochor-Komplex in ausreichender Menge und Reinheit zu bekommen, um sie strukturell aufzuklären. Möglicherweise würde dies zeigen, dass manche Proteine, die keine offensichtliche Sequenz-Homologie erkennen lassen, strukturell homolog sind.

## 6. Literatur-Verzeichnis

1. Adams, R. R., Wheatley, S. P., Gouldsworthy, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D. L. & Earnshaw, W. C. (2000) INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Current Biology* 10, 1075-8.
2. Adams, R. R., Eckley, D. M., Vagnarelli, P., Wheatley, S. P., Gerloff, D. L., Mackay, A. M., Svingen, P. A., Kaufmann, S. H. & Earnshaw, W. C. (2001) Human INCENP colocalizes with the Aurora-B/AIRK2 kinase on chromosomes and is overexpressed in tumour cells. *Chromosoma* 110, 65-74.
3. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (2000) *Molecular Biology of the Cell*. 4, edn, Garland Publishing Inc., New York.
4. Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goehl, M., Harper, J. W. & Elledge, S. J. (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86, 263-74.
5. Basrai, M. A. & Hieter, P. (1995) Is there a unique form of chromatin at the *Saccharomyces cerevisiae* centromeres? *Bioessays* 17, 669-72.
6. Berben, G., Legrain, M., Gilliquet, V. & Hilger, F. (1990) The yeast regulatory gene PHO4 encodes a helix-loop-helix motif. *Yeast* 6, 451-4.
7. Berlin, V., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1990) BIK1, a protein required for microtubule function during mating and mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*, colocalizes with tubulin. *Journal of Cell Biology* 111, 2573-86.
8. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. (2001a) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-6.
9. Bernstein, E., Denli, A. M. & Hannon, G. J. (2001b) The rest is silence. *RNA* 7, 1509-21.
10. Bischoff, F., Maier, G., Tilz, G. & Ponstingl, H. (1990) A 47-kDa Human Nuclear Protein Recognized by Antikinetochore Autoimmune Sera is Homologous with the Protein Encoded by RCC1, a Gene Implicated in Onset of Chromosome Condensation. *PNAS* 87, 8617-8621.
11. Brown, M. T., Goetsch, L. & Hartwell, L. H. (1993) MIF2 is required for mitotic spindle integrity during anaphase spindle elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 123, 387-403.
12. Brown, M. T. (1995) Sequence similarities between the yeast chromosome segregation protein Mif2 and the mammalian centromere protein CENP-C. *Gene* 160, 111-6.
13. Brown, W. & Tyler-Smith, C. (1995) Centromere activation. *Trends Genet.* 11, 337-9.

- 
14. **Buchwitz, B. J., Ahmad, K., Moore, L. L., Roth, M. B. & Henikoff, S.** (1999) A histone-H3-like protein in *C. elegans*. *Nature* 401, 547-8.
  15. **Bullock, W. O., Fernandez, J.M., Short, J.M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* Strain with b-Galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-379.
  16. **Cai, M. & Davis, R. W.** (1990) Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell* 61, 437-46.
  17. **Catasti, P., Chen, X., Mariappan, S. V., Bradbury, E. M. & Gupta, G.** (1999) DNA repeats in the human genome. *Genetica* 106, 15-36.
  18. **Chan, G. K., Schaar, B. T. & Yen, T. J.** (1998) Characterization of the kinetochore binding domain of CENP-E reveals interactions with the kinetochore proteins CENP-F and hBUBR1. *Journal of Cell Biology* 143, 49-63.
  19. **Chan, G. K., Jablonski, S. A., Sudakin, V., Hittle, J. C. & Yen, T. J.** (1999) Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome / APC. *Journal of Cell Biology* 146, 941-54.
  20. **Chan, H. L., Lee, Y. S., Hong, H. S. & Kuo, T. T.** (1994) Anticentromere antibodies (ACA): clinical distribution and disease specificity. *Clin. Exp. Dermatol* 19, 298-302.
  21. **Chen, M., Rockel, T., Steinweger, G., Hemmerich, P., Risch, J. & von Mikecz, A.** (2002) Subcellular recruitment of fibrillarin to nucleoplasmic proteasomes: implications for processing of a nucleolar autoantigen. *Mol. Biol. Cell* 13, 3576-87.
  22. **Chen, R. H., Waters, J. C., Salmon, E. D. & Murray, A. W.** (1996) Association of spindle assembly checkpoint component XMad2 with unattached kinetochores. *Science* 274, 242-6.
  23. **Chen, R. H., Shevchenko, A., Mann, M. & Murray, A. W.** (1998) Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *Journal of Cell Biology* 143, 283-95.
  24. **Choo, K. H., Brown, R., Webb, G., Craig, I. W. & Filby, R. G.** (1987) Genomic organization of human centromeric alpha satellite DNA: characterization of a chromosome 17 alpha satellite sequence. *DNA* 6, 297-305.
  25. **Choo, K. H.** (1997) Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Hum Genet* 61, 1225-33.
  26. **Choo, K. H.** (1998) Turning on the centromere. *Nat. Genet.* 18, 3-4.
  27. **Choo, K. H.** (2000) Centromerization. *Trends Cell Biol.* 10, 182-8.
  28. **Choo, K. H.** (2001) Domain organization at the centromere and neocentromere. *Dev. Cell* 1, 165-77.

- 
29. **Choo, K. H. A.** (1997) *The centromere*. Oxford University Press, Oxford, UK.
  30. **Cooke, C. A., Bernat, R. L. & Earnshaw, W. C.** (1990) CENP-B: a major human centromere protein located beneath the kinetochore. *Journal of Cell Biology* 110, 1475-88.
  31. **Craig, J. M., Earnshaw, W. C. & Vagnarelli, P.** (1999) Mammalian centromeres: DNA sequence, protein composition, and role in cell cycle progression. *Exp. Cell. Res.* 246, 249-62.
  32. **DeLuca, J. G., Moree, B., Hickey, J. M., Kilmartin, J. V. & Salmon, E. D.** (2002) hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells. *Journal of Cell Biology* 159, 549-55.
  33. **Dujardin, D., Wacker, U. I., Moreau, A., Schroer, T. A., Rickard, J. E. & De Mey, J. R.** (1998) Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *Journal of Cell Biology* 141, 849-62.
  34. **Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T.** (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
  35. **Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T.** (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
  36. **Elslinger, M. A., Wachter, R. M., Hanson, G. T., Kallio, K. & Remington, S. J.** (1999) Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry* 38, 5296-301.
  37. **Espelin, C. W., Kaplan, K. B. & Sorger, P. K.** (1997) Probing the architecture of a simple kinetochore using DNA-protein crosslinking. *J. Cell. Biol.* 139, 1383-96.
  38. **Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
  39. **Ford, A. L., Kurien, B. T., Harley, J. B. & Scofield, R. H.** (1998) Anti-centromere autoantibody in a patient evolving from a lupus/Sjogren's overlap to the CREST variant of scleroderma. *J. Rheumatol.* 25, 1419-24.
  40. **Fritzler, M. J. & Kinsella, T. D.** (1980) The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am J Med* 69, 520-6.
  41. **Goh, P. Y. & Kilmartin, J. V.** (1993) NDC10: a gene involved in chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 121, 503-12.
  42. **Goshima, G., Kiyomitsu, T., Yoda, K. & Yanagida, M.** (2003) Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *Journal of Cell Biology* 160, 25-39.



- 
43. **Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. & Hannon, G. J.** (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146-50.
  44. **He, D., Zeng, C., Woods, K., Zhong, L., Turner, D., Busch, R. K., Brinkley, B. R. & Busch, H.** (1998) CENP-G: a new centromeric protein that is associated with the alpha-1 satellite DNA subfamily. *Chromosoma* 107, 189-97.
  45. **He, X., Rines, D. R., Espelin, C. W. & Sorger, P. K.** (2001) Molecular analysis of kinetochore-microtubule attachment in budding yeast. *Cell* 106, 195-206.
  46. **Hegemann, J. H., Shero, J. H., Cottarel, G., Philippsen, P. & Hieter, P.** (1988) Mutational analysis of centromere DNA from chromosome VI of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2523-35.
  47. **Hegemann, J. H. & Fleig, U. N.** (1993) The centromere of budding yeast. *Bioessays* 15, 451-60.
  48. **Hemmerich, P., Stoyan, T., Wieland, G., Koch, M., Lechner, J. & Diekmann, S.** (2000a) Interaction of yeast kinetochore proteins with centromere-protein/transcription factor cbf1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 12583-8.
  49. **Hemmerich, P. & von Mikecz, A.** (2000b) Antinuclear autoantibodies: fluorescent highlights on structure and function in the nucleus. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 123, 16-27.
  50. **Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J. S. & van Steensel, B.** (2000) Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 716-21.
  51. **Henikoff, S., Ahmad, K. & Malik, H. S.** (2001) The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 293, 1098-102.
  52. **Henikoff, S.** (2002) Near the edge of a chromosome's "black hole". *Trends Genet.* 18, 165-7.
  53. **Henikoff, S. & Malik, H. S.** (2002) Centromeres: selfish drivers. *Nature* 417, 227.
  54. **Howman, E. V., Fowler, K. J., Newson, A. J., Redward, S., MacDonald, A. C., Kalitsis, P. & Choo, K. H.** (2000) Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 1148-53.
  55. **Hoyt, M. A., He, L., Totis, L. & Saunders, W. S.** (1993) Loss of Function of *Saccharomyces cerevisiae* Kinesin-Related CIN8 and KIP1 Is Suppressed by KAR3 Motor Domain Mutations. *Genetics* 135, 35-44.
  56. **Hoyt, M. A. & Geiser, J. R.** (1996) Genetic analysis of the mitotic spindle. *Annu. Rev. Genet.* 30, 7-33.

- 
57. **Hoyt, M. A.** (2001) A new view of the spindle checkpoint. *Journal of Cell Biology* 154, 909-11.
58. **Janke, C., Ortiz, J., Lechner, J., Shevchenko, A., Magiera, M. M., Schramm, C. & Schiebel, E.** (2001) The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control. *Embo J.* 20, 777-91.
59. **Jiang, W. & Carbon, J.** (1993a) Molecular analysis of the budding yeast centromere/kinetochore. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 58, 669-76.
60. **Jiang, W., Lechner, J. & Carbon, J.** (1993b) Isolation and characterization of a gene (CBF2) specifying a protein component of the budding yeast kinetochore. *J. Cell. Biol.* 121, 513-9.
61. **Kaplan, K. B., Hyman, A. A. & Sorger, P. K.** (1997) Regulating the yeast kinetochore by ubiquitin-dependent degradation and Skp1p-mediated phosphorylation. *Cell* 91, 491-500.
62. **Keith, K. C., Baker, R. E., Chen, Y., Harris, K., Stoler, S. & Fitzgerald-Hayes, M.** (1999) Analysis of primary structural determinants that distinguish the centromere-specific function of histone variant Cse4p from histone H3. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6130-6139.
63. **Kennerdell J.R. & Carthew** (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 7, 1017-1026.
64. **Kennerdell, J. R., Yamaguchi, S. & Carthew, R. W.** (2002) RNAi is activated during Drosophila oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E. *Genes Dev.* 16, 1884-9.
65. **Kiesslich, A., von Mikecz, A. & Hemmerich, P.** (2002) Cell cycle-dependent association of PML bodies with sites of active transcription in nuclei of mammalian cells. *J. Struct. Biol.* 140, 167-79.
66. **Kitagawa, K., Masumoto, H., Ikeda, M. & Okazaki, T.** (1995) Analysis of protein-DNA and protein-protein interactions of centromere protein B (CENP-B) and properties of the DNA-CENP-B complex in the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1602-12.
67. **Kitagawa, K., Skowyra, D., Elledge, S. J., Harper, J. W. & Hieter, P.** (1999) SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell* 4, 21-33.
68. **Kitagawa, K. & Hieter, P.** (2001) Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 678-87.

- 
69. Kosco, K. A., Pearson, C. G., Maddox, P. S., Wang, P. J., Adams, I. R., Salmon, E. D., Bloom, K. & Huffaker, T. C. (2001) Control of microtubule dynamics by Stu2p is essential for spindle orientation and metaphase chromosome alignment in yeast. *Mol. Biol. Cell* 12, 2870-80.
70. Kuras, L., Barbey, R. & Thomas, D. (1997) Assembly of a bZIP-bHLH transcription activation complex: formation of the yeast Cbf1-Met4-Met28 complex is regulated through Met28 stimulation of Cbf1 DNA binding. *EMBO J.* 16, 2441-51.
71. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
72. Lechner, J. & Carbon, J. (1991) A 240 kd multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere. *Cell* 64, 717-25.
73. Lechner, J. (1994) A zinc finger protein, essential for chromosome segregation, constitutes a putative DNA binding subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore complex, Cbf3. *EMBO J.* 13, 5203-11.
74. Lechner, J. & Ortiz, J. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore. *FEBS Lett.* 389, 70-4.
75. Lewin, H. A. (2000) *Genes VII*. Oxford University Press, Oxford.
76. Li, Y. & Murray, A. (1991) Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 9, 519-31.
77. Liao, H., Winkfein, R., Mack, G., Rattner, J. & Yen, T. (1995) CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J. Cell Biol.* 130, 507-518.
78. Lin, H., Choi, J. H., Hasek, J., DeLillo, N., Lou, W. & Vancura, A. (2000) Phospholipase C is involved in kinetochore function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3597-607.
79. Lin, H., de Carvalho, P., Kho, D., Tai, C. Y., Pierre, P., Fink, G. R. & Pellman, D. (2001) Polyploids require Bik1 for kinetochore-microtubule attachment. *Journal of Cell Biology* 155, 1173-84.
80. Lottspeich & Zorbas (1998) *Bioanalytik*. Vol. 1, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
81. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-60.
82. Luger, K. & Richmond, T. J. (1998a) The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 140-6.
83. Luger, K. & Richmond, T. J. (1998b) DNA binding within the nucleosome core. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 33-40.

- 
84. **Mackay, A. M. & Earnshaw, W. C.** (1993a) The INCENPs: structural and functional analysis of a family of chromosome passenger proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 58, 697-706.
85. **Mackay, A. M., Eckley, D. M., Chue, C. & Earnshaw, W. C.** (1993b) Molecular analysis of the INCENPs (inner centromere proteins): separate domains are required for association with microtubules during interphase and with the central spindle during anaphase. *Journal of Cell Biology* 123, 373-85.
86. **Martin-Lluesma, S., Stucke, V. M. & Nigg, E. A.** (2002) Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. *Science* 297, 2267-70.
87. **Meluh, P. B. & Koshland, D.** (1995) Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol. Biol. Cell* 6, 793-807.
88. **Meluh, P. B. & Koshland, D.** (1997) Budding yeast centromere composition and assembly as revealed by in vivo cross-linking. *Genes Dev.* 11, 3401-12.
89. **Meluh, P. B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D. & Smith, M. M.** (1998) Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 94, 607-13.
90. **Meluh, P. B. & Strunnikov, A. V.** (2002) Beyond the ABCs of CKC and SCC. Do centromeres orchestrate sister chromatid cohesion or vice versa? *Eur. J. Biochem.* 269, 2300-14.
91. **Michal, G.** (1999) *Biochemical pathways - Biochemie Atlas*. 1. edn, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
92. **Mullis, K., Faloona, Scharf, Saiki, Horn & Erlich** (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, 1986. *Biotechnology* 124, 17-27.
93. **Muro, Y., Masumoto, H., Yoda, K., Nozaki, N., Ohashi, M. & Okazaki, T.** (1992) Centromere protein B assembles human centromeric alpha-satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box. *Journal of Cell Biology* 116, 585-96.
94. **Nabetani, A., Koujin, T., Tsutsumi, C., Haraguchi, T. & Hiraoka, Y.** (2001) A conserved protein, Nuf2, is implicated in connecting the centromere to the spindle during chromosome segregation: a link between the kinetochore function and the spindle checkpoint. *Chromosoma* 110, 322-34.
95. **Nishihashi, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Ikemura, T., Regnier, V., Dodson, H., Earnshaw, W. C. & Fukagawa, T.** (2002) CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells. *Dev. Cell* 2, 463-76.

- 
96. **Ortiz, J., Stemmann, O., Rank, S. & Lechner, J.** (1999) A putative protein complex consisting of Ctf19, Mcm21, and Okp1 represents a missing link in the budding yeast kinetochore. *Genes Dev.* 13, 1140-55.
  97. **Perez, F., Diamantopoulos, G. S., Stalder, R. & Kreis, T. E.** (1999) CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* 96, 517-27.
  98. **Perez, F., Pernet-Gallay, K., Nizak, C., Goodson, H. V., Kreis, T. E. & Goud, B.** (2002) CLIPR-59, a new trans-Golgi/TGN cytoplasmic linker protein belonging to the CLIP-170 family. *Journal of Cell Biology* 156, 631-42.
  99. **Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J. E. & Kreis, T. E.** (1992) CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* 70, 887-900.
  100. **Pierre, P., Pepperkok, R. & Kreis, T. E.** (1994) Molecular characterization of two functional domains of CLIP-170 in vivo. *J. Cell Sci.* 107, 1909-20.
  101. **Politi, V., Perini, G., Trazzi, S., Pliss, A., Raska, I., Earnshaw, W. C. & Della Valle, G.** (2002) CENP-C binds the alpha-satellite DNA in vivo at specific centromere domains. *J. Cell Sci.* 115, 2317-27.
  102. **Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J.** (1992) Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-33.
  103. **Rattner, J. B., Rao, A., Fritzler, M. J., Valencia, D. W. & Yen, T. J.** (1993) CENP-F is a .ca 400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization. *Cell Motil. Cytoskeleton* 26, 214-26.
  104. **Rudner, A. & Murray, A.** (1996) The spindle assembly checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 773-80.
  105. **Saffery, R., Irvine, D. V., Griffiths, B., Kalitsis, P., Wordeman, L. & Choo, K. H.** (2000) Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of >20 functionally important kinetochore-associated proteins [In Process Citation]. *Hum. Mol. Genet.* 9, 175-85.
  106. **Saifitdinova, A. F., Derjusheva, S. E., Malykh, A. G., Zhurov, V. G., Andreeva, T. F. & Gaginskaya, E. R.** (2001) Centromeric tandem repeat from the chaffinch genome: isolation and molecular characterization. *Genome* 44, 96-103.
  107. **Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. & Arnheim N.** (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
  108. **Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB & Erlich** (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324, 163-166.

- 
109. **Saitoh, H., Tomkiel, J., Cooke, C. A., Ratrie, H., 3rd, Maurer, M., Rothfield, N. F. & Earnshaw, W. C.** (1992a) CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell* 70, 115-25.
  110. **Saitoh, H., Tomkiel, J., Cooke, C. A., Ratrie, H. d., Maurer, M., Rothfield, N. F. & Earnshaw, W. C.** (1992b) CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell* 70, 115-25.
  111. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2 edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  112. **Sato T., Jigami, Suzuki T. & Uemura** (1999) A human gene, hSGT1, can substitute for GCR2, which encodes a general regulatory factor of glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 6, 535-540.
  113. **Sharp, P. A.** (1999) RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev.* 13, 139-41.
  114. **Shelby, R. D., Vafa, O. & Sullivan, K. F.** (1997) Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *Journal of Cell Biology* 136, 501-13.
  115. **Smith, M. M.** (2002) Centromeres and variant histones: what, where, when and why? *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 279-85.
  116. **Sorger, P. K., Doheny, K. F., Hieter, P., Kopski, K. M., Huffaker, T. C. & Hyman, A. A.** (1995) Two genes required for the binding of an essential *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore complex to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 12026-30.
  117. **Spector, D. L., Goldman, R. D. & A., L. L.** (1997) *Cells, A Laboratory Manual*. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
  118. **Stemmann, O. & Lechner, J.** (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore contains a cyclin-CDK complexing homologue, as identified by in vitro reconstitution. *EMBO J.* 15, 3611-20.
  119. **Stemmann, O., Neidig, A., Kocher, T., Wilm, M. & Lechner, J.** (2002) Hsp90 enables Ctf13p/Skp1p to nucleate the budding yeast kinetochore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 8585-90.
  120. **Stoler, S., Keith, K. C., Curnick, K. E. & Fitzgerald-Hayes, M.** (1995) A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin- associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev.* 9, 573-86.
  121. **Straight, A. F.** (1997) Cell cycle: checkpoint proteins and kinetochores. *Current Biology* 7, R613-6.
  122. **Straight, A. F., Marshall, W. F., Sedat, J. W. & Murray, A. W.** (1997) Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate. *Science* 277, 574-8.

- 
123. **Strunnikov, A. V., Kingsbury, J. & Koshland, D.** (1995) CEP3 encodes a centromere protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 128, 749-60.
  124. **Studier, F. W. M., B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
  125. **Sugata, N., Munekata, E. & Todokoro, K.** (1999) Characterization of a novel kinetochore protein, CENP-H. *J. Biol. Chem.* 274, 27343-6.
  126. **Sugata, N., Li, S., Earnshaw, W. C., Yen, T. J., Yoda, K., Masumoto, H., Munekata, E., Warburton, P. E. & Todokoro, K.** (2000) Human CENP-H multimers colocalize with CENP-A and CENP-C at active centromere--kinetochore complexes. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2919-26.
  127. **Sugimoto, K., Kuriyama, K., Shibata, A. & Himeno, M.** (1997) Characterization of internal DNA-binding and C-terminal dimerization domains of human centromere/kinetochore autoantigen CENP-C in vitro: role of DNA-binding and self-associating activities in kinetochore organization. *Chromosome Res.* 5, 132-41.
  128. **Sugimoto, K., Fukuda, R. & Himeno, M.** (2000) Centromere/kinetochore localization of human centromere protein A (CENP- A) exogenously expressed as a fusion to green fluorescent protein. *Cell Struct. Funct.* 25, 253-61.
  129. **Sullivan, B. & Karpen, G.** (2001) Centromere identity in *Drosophila* is not determined in vivo by replication timing. *Journal of Cell Biology* 154, 683-90.
  130. **Sullivan, K. F. & Glass, C. A.** (1991) CENP-B is a highly conserved mammalian centromere protein with homology to the helix-loop-helix family of proteins. *Chromosoma* 100, 360-70.
  131. **Sullivan, K. F., Hechenberger, M. & Masri, K.** (1994) Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *Journal of Cell Biology* 127, 581-92.
  132. **Sullivan, K. F.** (2001) A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 182-8.
  133. **Sullivan, M., Lehane, C. & Uhlmann, F.** (2001) Orchestrating anaphase and mitotic exit: separase cleavage and localization of Slk19. *Nat. Cell Biol.* 3, 771-7.
  134. **Takahashi, K., Chen, E. S. & Yanagida, M.** (2000) Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science* 288, 2215-9.
  135. **Tan, E. M., Rodnan, G. P., Garcia, I., Moroi, Y., Fritzler, M. J. & Peebles, C.** (1980) Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum.* 23, 617-25.

- 
136. **Tan, E. M.** (1988) Antinuclear antibodies: diagnostic markers and clues to the basis of systemic autoimmunity. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7, S3-9.
137. **Tan, E. M.** (1989) Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44, 93-151.
138. **Taylor, S. S., Ha, E. & McKeon, F.** (1998) The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *Journal of Cell Biology* 142, 1-11.
139. **Thrower, D. A., Jordan, M. A., Schaar, B. T., Yen, T. J. & Wilson, L.** (1995) Mitotic HeLa cells contain a CENP-E-associated minus end-directed microtubule motor. *Embo J.* 14, 918-26.
140. **Thrower, D. A., Jordan, M. A. & Wilson, L.** (1996) Modulation of CENP-E organization at kinetochores by spindle microtubule attachment. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 35, 121-33.
141. **Trazzi, S., Bernardoni, R., Diolaiti, D., Politi, V., Earnshaw, W. C., Perini, G. & Della Valle, G.** (2002) In vivo functional dissection of human inner kinetochore protein CENP-C. *J. Struct. Biol.* 140, 39-48.
142. **Vagnarelli, P. B. & Earnshaw, W. C.** (2001) INCENP loss from an inactive centromere correlates with the loss of sister chromatid cohesion. *Chromosoma* 110, 393-401.
143. **Wells, D. & McBride, C.** (1989) A comprehensive compilation and alignment of histones and histone genes. *Nucleic Acids Res.* 17, 311-46.
144. **Wieland, G.** (1999) *Diplomarbeit im Fach Biochemie (Diplom): Untersuchungen zu Protein/Protein- und Protein/DNA-Wechselwirkungen am Centromer von Saccharomyces cerevisiae*, Diplomarbeit, Universität Leipzig
145. **Wieland, G., Hemmerich, P., Koch, M., Stoyan, T., Hegemann, J. & Diekmann, S.** (2001) Determination of the binding constants of the centromere protein Cbf1 to all 16 centromere DNAs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 29, 1054-60.
146. **Wigge, P. A. & Kilmartin, J. V.** (2001) The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *Journal of Cell Biology* 152, 349-60.
147. **Yang, C. H., Tomkiel, J., Saitoh, H., Johnson, D. H. & Earnshaw, W. C.** (1996) Identification of overlapping DNA-binding and centromere-targeting domains in the human kinetochore protein CENP-C. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3576-86.
148. **Yen, T. J., Compton, D. A., Wise, D., Zinkowski, R. P., Brinkley, B. R., Earnshaw, W. C. & Cleveland, D. W.** (1991) CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *Embo J.* 10, 1245-54.



- 
149. **Yen, T. J., Li, G., Schaar, B. T., Szilak, I. & Cleveland, D. W.** (1992) CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis. *Nature* 359, 536-9.
150. **Yoda, K., Kitagawa, K., Masumoto, H., Muro, Y. & Okazaki, T.** (1992) A human centromere protein, CENP-B, has a DNA binding domain containing four potential alpha helices at the NH2 terminus, which is separable from dimerizing activity. *Journal of Cell Biology* 119, 1413-27.
151. **Yoon, H. J. & Carbon, J.** (1999) Participation of Bir1p, a member of the inhibitor of apoptosis family, in yeast chromosome segregation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 13208-13.
152. **Zeitlin, S. G., Barber, C. M., Allis, C. D., Sullivan, K. F. & Sullivan, K.** (2001a) Differential regulation of CENP-A and histone H3 phosphorylation in G2/M. *J. Cell. Sci.* 114, 653-61.
153. **Zeitlin, S. G., Shelby, R. D. & Sullivan, K. F.** (2001b) CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *Journal of Cell Biology* 155, 1147-58.
154. **Zeng, X., Kahana, J. A., Silver, P. A., Morpew, M. K., McIntosh, J. R., Fitch, I. T., Carbon, J. & Saunders, W. S.** (1999) Slk19p is a centromere protein that functions to stabilize mitotic spindles. *Journal of Cell Biology* 146, 415-25.
155. **Zeng, X. & Saunders, W. S.** (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* centromere protein Slk19p is required for two successive divisions during meiosis. *Genetics* 155, 577-87.
156. **Zhang H., Kobayashi R., Galaktionov K. & Beach** (1995) p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* 6, 915-925.
157. **Zhu, X., Chang, K. H., He, D., Mancini, M. A., Brinkley, W. R. & Lee, W. H.** (1995a) The C terminus of mitotin is essential for its nuclear localization, centromere/kinetochore targeting, and dimerization. *J. Biol. Chem.* 270, 19545-50.
158. **Zhu, X., Mancini, M. A., Chang, K. H., Liu, C. Y., Chen, C. F., Shan, B., Jones, D., Yang-Feng, T. L. & Lee, W. H.** (1995b) Characterization of a novel 350-kilodalton nuclear phosphoprotein that is specifically involved in mitotic-phase progression. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5017-29.
159. **Zhu, X., Ding, L. & Pei, G.** (1997) Carboxyl terminus of mitotin is sufficient to confer spindle pole localization. *J. Cell. Biochem.* 66, 441-9.

---

## Selbständigkeitserklärung

- Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist, ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und benutzten Quellen angegeben habe.
- Alle Personen, die mich bei Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, habe ich benannt.
- Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen.
- Dritte Personen haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
- Die vorliegende Arbeit wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Sie wurde ebenso auch nicht als Dissertation bei einer anderen Hochschule eingereicht.

Jena, den 07. Februar 2003

---

# Lebenslauf

**Name:** Gerhard Dieter Wieland

**Geburtsdatum:** 07. August 1966

**Geburtsort:** Nürnberg

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Familienstand:** ledig

**Konfession:** evang. luth.

**Bildungsweg:** Grundschule Altenberg 1972 - 1976  
Gymnasium Oberasbach 1976 - 1985  
Allgemeine Hochschulreife (Abitur) 26.06.1985

**Studium:** Studium der Chemie / Diplom an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg 1985-1995  
  
Studium der Biochemie / Diplom an der Universität Leipzig ab dem Wintersemester 1995/96  
  
Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biotechnologie (IMB) e.V. in Jena, Abteilung für Molekularbiologie  
Thema: Protein/Protein- und Protein/DNA-Wechselwirkungen am Centromer von *S. cerevisiae*.  
Betreuer: Prof. Dr. Stephan Diekmann.  
  
Diplom-Biochemiker seit dem 30. März 1999.

**Doktorarbeit:** 06/2000 – 02/2003  
Institut für Molekulare Biotechnologie (IMB) e.V. in Jena, Abteilung für Molekularbiologie  
Betreuer: Prof. Dr. Stephan Diekmann.

Jena, den 07. Februar 2003

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Poster

**Wieland, G.** (1999), Untersuchungen zu Protein/Protein- und Protein/DNA-Wechselwirkungen am Centromer von *Saccharomyces cerevisiae*, Diplomarbeit im Fach Biochemie (Diplom), *Universität Leipzig* [Wieland (1999)].

**Hemmerich, P., Stoyan, T., Wieland, G., Koch, M., Lechner, J. & Diekmann, S.** (2000) Interaction of yeast kinetochore proteins with centromere- protein/transcription factor Cbf1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 12583-12588 [Hemmerich *et al.* (2000a)].

**Wieland, G., Koch, M., Stoyan, T., Diekmann, S. & Hemmerich, P.** (2000), Assembly of the centromere complex from *Saccharomyces cerevisiae*: Molecular interactions between Cpf1/CDEI and Cbf3 components, *Poster bei dem Keystone-Symposium: Chromatin Structure and Funktion, Februar 2000, Durango, Colorado, USA.*

**Posterpreis der Organisatoren.**

**Wieland, G., Hemmerich, P., Koch, M., Stoyan, T., Hegemann, J. & Diekmann, S.** (2001) Determination of the binding constants of the centromere protein Cbf1 to all 16 centromere DNAs of *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.* 29, 1054-1060 [Wieland *et al.* (2001)].

### Manuskripte in Vorbereitung:

**Wieland, G., Orthaus, S., Ohndorf, Diekmann, S. & Hemmerich P.** (2003) Functional complementation of human centromere protein A (CENP-A) by Cse4p from *Saccharomyces cerevisiae*, submitted to Cell.

**Wieland, G., Hemmerich P. & Diekmann, S.** (2003), *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore proteins colocalise with the human centromere, *N.N.*

**Orthaus, S., Wieland, G., Perez, F., Hemmerich P. & Diekmann, S.** (2003), CLIP-170 is involved in human mitotic cell cycle control; Is CLIP-170 the APC complex inhibitor? *N.N.*

---

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stephan Diekmann, der durch die Bereitstellung des hochinteressanten Themas, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und viele anregende Diskussionen das Entstehen dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

Bei Herrn Dr. Peter Hemmerich möchte ich mich herzlich für seine engagierte Betreuung, seine Einführung in die hohe Schule der Zell- und Molekularbiologie und die gute Zusammenarbeit und nicht zuletzt seinen fachlichen Rat bei der schriftlichen Niederlegung der Ergebnisse dieser Arbeit bedanken.

Frau Sabine Ohndorf danke ich herzlich für die unermüdliche Bereitschaft zur zuverlässigen Durchführung von Western-Blots.

Frau Marianne Koch danke ich für ihre selbstlose technische Unterstützung im Labor.

Herrn Dr. Thomas Hettmann gebührt Dank für seine ständige Bereitschaft, mir im Laboralltag mit Ratschlägen zur Seite zu stehen, und für das Korrektur-Lesen dieser Arbeit.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Molekularbiologie möchte ich mich für das gute Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit bedanken.

Bei allen Kooperationspartnern, die mir mit der großzügigen Bereitstellung von Materialien, Literatur und hilfreichen Tipps zur Seite standen, bedanke ich mich sehr herzlich.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für ihre unermüdliche liebevolle Unterstützung während des Studiums und der Promotion und ihre große Geduld.